

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**



Attorney Docket No. 02356.0086  
Customer Number 22,852

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Application of:

Pierre DRUILHE et al.

Application No.: 10/712,533

Filed: November 14, 2003

For: PLASMODIUM FALCIPARUM  
ANTIGENS AND VACCINE AND  
DIAGNOSTIC USES THEREOF

)  
)  
) Group Art Unit:  
)  
) Examiner:  
)  
)  
)  
)

**Commissioner for Patents**  
**P.O. Box 1450**  
**Alexandria, VA 22313-1450**

Sir:

**CLAIM FOR PRIORITY**

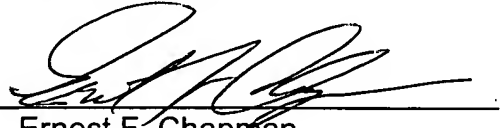
Under the provisions of 35 U.S.C. § 119, Applicants hereby claim the benefit of the filing date of Canadian Patent Application Nos. 2,345,206, filed May 16, 2001; and 2,346,968, filed May 23, 2001, for the above-identified U.S. patent application.

In support of this claim for priority, enclosed is one certified copy of each priority application.

Respectfully submitted,

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,  
GARRETT & DUNNER, L.L.P.

Dated: August 4, 2004

By:   
Ernest F. Chapman  
Reg. No. 25,961

EFC/FPD/gah  
Enclosures



Office de la propriété  
Intellectuelle  
du Canada

Un organisme  
d'Industrie Canada

Canadian  
Intellectual Property  
Office

An Agency of  
Industry Canada

*Bureau canadien  
des brevets  
Certification*

*Canadian Patent  
Office  
Certification*

La présente atteste que les documents  
ci-joints, dont la liste figure ci-dessous,  
sont des copies authentiques des docu-  
ments déposés au Bureau des brevets.

This is to certify that the documents  
attached hereto and identified below are  
true copies of the documents on file in  
the Patent Office.

Mémoire descriptif et dessins, de la demande de brevet no: 2,345,206, tels que déposés, le  
16 mai 2001, par **INSTITUT PASTEUR**, cessionnaire de Pierre Druilhe et Anne-  
Charlotte Gruner, ayant pour titre: "Antigènes de Plasmodium Falciparum et Leurs  
Applications Vaccinales et Diagnostiques".

  
Agent certificateur/Certifying Officer

28 mai 2004

Date

Canada

(CIPO 68)  
04-09-02

OPIC



CIPO

## ANTIGÈNES DE PLASMODIUM FALCIPARUM ET LEURS APPLICATIONS VACCINALES ET DIAGNOSTIQUES

### CONTEXTE DE L'INVENTION

#### 5 a) Domaine de l'invention

La présente invention se rapporte à de nouveaux antigènes de *Plasmodium falciparum* et à leurs applications vaccinales et diagnostiques. Plus particulièrement, la présente invention vise des molécules polynucléotidiques et polypeptidiques immunogéniques, des compositions les comprenant, et des  
10 méthodes de diagnostic et de vaccination du paludisme.

#### b) Brève description de l'art antérieur

Le paludisme est une maladie provoquée par l'infection de parasites protozoaires appartenant aux apicomplexes de l'espèce *Plasmodium* et transmis  
15 par les femelles des moustiques du genre *Anopheles*. Malgré le fait que l'OMS a classé, depuis 1998, le paludisme parmi les trois maladies infectieuses d'intérêt majeur pour la santé publique mondiale au même rang que la tuberculose et le SIDA, il n'existe pas encore de vaccin efficace contre cette maladie.

Des études précédentes ont conduit à la mise en évidence de polypeptides  
20 antigéniques du stade pré-érythrocytaire de la maladie, notamment les polypeptides SALSA (pour Sporozoite Liver Stage Antigen) décrits dans EP A-0407230, le LSA 1 (pour Liver Stage Antigen) décrit dans WO 92/13884 et LSA-3 décrit dans FR 2,735,478.

La présente invention est relative à de nouvelles molécules  
25 polynucléotidiques et polypeptidiques spécifiques du stade pré-érythrocytaire et à leurs utilisations à titre de principe actif de vaccin anti-palustre ou dans des méthodes de diagnostics de la maladie.

### RÉSUMÉ DE L'INVENTION

30 La Demanderesse a identifié une série de 120 fragments d'ADN génomique codant pour des protéines exprimées aux stades pré-érythrocytaires, c'est-à-dire au stade sporozoïte et/ou au stade hépatique. La caractérisation



## 2

initiale de cette série de clones a conduit à identifier l'antigène LSA-1, puis SALSA, puis STARP, puis LSA-3. Des travaux plus récents portant sur 10 fragments de la même banque de clones codant pour des stades pré-érythrocytaires a permis de fournir des précisions concernant 8 d'entre eux, 3 se  
5 sont avérés être des gènes déjà connus comme étant exprimés au stade érythrocytaire et les 5 autres comme des gènes nouveaux non décrits à ce jour, et dont l'expression aux stades pré-érythrocytaires a pu être confirmée.

Par ailleurs, les travaux réalisés en utilisant les cellules de volontaires protégés par sporozoïtes irradiés, celles de chimpanzés protégés par la même  
10 méthode et celles de chimpanzés comme d'*Aotus trivirgatus*, protégés par immunisation par l'antigène LSA-3 ont conduit à caractériser les réponses cellulaires à fort taux de sécretion d'Interféron- $\gamma$ , généralement associés avec une faible production d'anticorps, comme étant associées avec l'état de protection, et vice-versa.

15 Parmi les nouveaux gènes pré-érythrocytaires étudiés, deux d'entre eux, dénommés DG747 et DG772 possèdent plusieurs propriétés remarquables : ils génèrent des réponses cellulaires à taux élevé d'Interféron- $\gamma$ , détectées par ELISPOT chez des volontaires protégés par sporozoïtes irradiés, qui sont retrouvés également pour plusieurs régions de l'antigène LSA-3 mais qui sont  
20 absentes pour 4 régions de l'antigène LSA-1, deux de SALSA, deux de STARP et deux de la CircumSporozoïte protein. Ces deux mêmes clones sont positifs également dans les mêmes tests chez les chimpanzés protégés par des sporozoïtes irradiés. Le profil de réponse différentielle entre les chimpanzés protégés et celles de chimpanzés ayant reçu des sporozoïtes irradiés à trop forte  
25 dose, et non protégés, est identique à celui enregistré avec la molécule LSA-3 qui est capable d'induire une protection. Ce profil de réponse correspond, d'après les travaux réalisés chez le rongeur, à la capacité d'induire un recrutement cellulaire spécifique au niveau intra-hépatique. La séquence complète des deux gènes a été identifiée. Les protéines correspondantes ont une antigénicité élevée  
30 chez les individus exposés au parasite en zone d'endémie (réaction chez 80% des adultes de zone d'endémie). Leur localisation en surface du sporozoïte et leur production au cours de la maturation intra-hépatique du parasite a été

- confirmée par diverses méthodes biologiques. Leur immunogénicité chez l'animal sous forme de protéines recombinantes, ou sous forme de plasmides (immunisation génétique) a été démontrée. Ces caractéristiques en font des candidats importants qui demandent à être l'objet d'études complémentaires, en particulier d'immunisation et de challenge chez le primate supérieur pour obtenir des formulations vaccinales nouvelles, seules ou associées à l'antigène LSA-3.

### DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION

- L'originalité de la présente invention porte sur la mise en évidence de nouvelles molécules polynucléotidiques et polypeptidiques spécifiques du stade pré-érythrocytaire et à leurs utilisations à titre de principe actif de vaccin anti-palustre ou dans des méthodes de diagnostics de la maladie. Parmi les nouvelles molécules identifiées, plusieurs possèdent des propriétés remarquables: ils génèrent notamment des réponses cellulaires à taux élevé d'interféron- $\gamma$  chez des volontaires humains et des chimpanzés protégés par des sporozoïtes irradiés. Certains polypeptides de l'invention ont également un antigénicité élevée chez les individus exposés au parasite en zone d'endémie.

### EXEMPLES

- Les exemples qui suivent servent à illustrer l'étendue d'utilisation de la présente invention et non à limiter sa portée. Des modifications et variations peuvent y être effectués sans que l'on échappe à l'esprit et à la portée de l'invention. Bien que l'on puissent utiliser d'autres méthodes ou produits équivalents à ceux que l'on retrouve ci-dessous pour tester ou réaliser la présente invention, le matériel et les méthodes préférés sont décrits.

#### 1) INTRODUCTION

##### **Historique du paludisme**

- Le paludisme est une maladie provoquée par l'infection de parasites protozoaires appartenant aux apicomplexes de l'espèce *Plasmodium* et transmis par les femelles des moustiques du genre *Anopheles*. Les efforts soutenus et le programme d'éradication entamé dans les années 50, financé par l'OMS ont

## 4

permis de limiter les zones où la maladie se propageait et de diminuer le nombre de personnes infectées. Depuis, la baisse d'efficacité des moyens de lutte contre le parasite a provoqué une augmentation des cas de paludisme par rapport à il y a 20 ans. Aujourd'hui le paludisme demeure concentré dans la ceinture sub-tropicale où entre 300 et 500 millions de cas cliniques sont recensés annuellement, dont au minimum 3 millions succombent en majorité à cause de l'infection par le *P. falciparum*. Suite à l'apparition et à l'extension d'une résistance globale aux seuls médicaments efficaces, et parce que les régions affectées sont en extension, l'OMS a classé, depuis 1998, le paludisme parmi les trois maladies infectieuses d'intérêt majeur pour la santé publique mondiale au même rang que la tuberculose et le SIDA.

La description de l'infection paludéenne, dont les signes cliniques sont très caractéristiques, peut être retrouvée dans des écrits des civilisations les plus anciennes, tels que le *Nei Ching*, grand répertoire médical pour l'empereur chinois Huang Ti (2700 av. J. C.), des tablettes Mésopotamiennes (2000 av. J. C.), des papyrus Egyptiens (1500 av. J. C.) et des écrits Védiques (1500-800 av. J. C.). Une partie du « livre des épidémies » d'Hippocrate (460-370 av. J. C.) a été consacrée à la description détaillée de fièvres tertiaires ou quaternaires où est mentionnée aussi une relation entre des splénomégales et la proximité des zones marécageuses. D'ailleurs, le terme paludisme désigne une fièvre issue des zones marécageuses (L. palude = marécage), ce qui est aussi reflété par le terme de malaria (l. mail'aria) probablement introduit par Sansovino en 1560 pour décrire le « mauvais air » issu des marécages. Le drainage de ces zones a été un des seuls moyens de contrôle du paludisme connu avant la découverte de l'agent infectieux. Malgré la connaissance des signes cliniques, le parasite causant la maladie n'a été découvert qu'à la fin du 19<sup>e</sup> siècle.

En 1880 Charles Louis Alphonse Laveran a observé l'exflagellation de microgamètes et des hématies altérées dans le sang de (Laveran, 1880), et il a associé ces formes avec la maladie. Ses conclusions ont été controversées et ne furent acceptées par d'autres, en particulier par l'importante école italienne, que 5 ans plus tard. Le mode de transmission de la maladie est resté inconnu encore 12 ans. Patrick Manson avait en 1877 démontré que le nématode de la filariose

(Elephantiasis) était transmis par un moustique. Il était convaincu que le paludisme suivait un parcours semblable. Il a conseillé à Ronald Ross d'entamer des recherches à ce sujet et ce dernier a décrit en 1897, pour la première fois, des oocystes chez des moustiques ayant été nourris sur des humains infectés.

- 5 Puis, à l'aide de *Plasmodium* d'oiseaux, il a pu décrire le cycle entier du parasite chez le moustique. Ce cycle a été confirmé, en 1898, pour les espèces plasmodiales de l'homme par les chercheurs Italiens menés par Battista Grassi.

- On a longtemps cru qu'après inoculation par le moustique, le sporozoïte envahissait directement le globule rouge du mammifère hôte, initiant ainsi le cycle sanguin asexué et sexué. Un cycle exo-érythrocytaire fut décrit dès 1908  
10 chez des plasmodies d'oiseaux par H. de Beaulaire Aragao qui démontra le développement de formes atypiques, dans des cellules endothéliales et des macrophages, capables de libérer des formes envahissant les globules rouges et de se transformer en formes typiques pigmentées du parasite. Toutefois on a cru  
15 que le cycle tissulaire était une forme particulière de ces espèces plasmodiales. Ce n'est qu'en raison des observations faites au cours d'infections paludéennes induites et suivies étroitement chez des individus (comme la malariothérapie des années 1920-50) que la présence d'un stade supplémentaire tissulaire a été postulée puis activement recherchée. Les formes pré-érythrocytaires des  
20 parasites de primates et d'humains n'ont été découvertes qu'en 1948 lorsque H.E. Shortt et P. C. C. Garnham ont décrit des formes hépatiques issues d'inoculations de sporozoïtes de *P. cynomolgi* (proche de *P. vivax*) chez le singe rhésus (Shortt and Garnham, 1948). En 1951, les mêmes stades ont été décrits pour *P. falciparum* (Shortt et al., 1951) dans une expérience remarquable où une  
25 biopsie de foie a été prélevée chez un volontaire préalablement inoculé avec des millions de sporozoïtes. Toutefois les recrudescences dues à *P. vivax* ou à *P. ovale* n'étaient pas expliquées, et on a émis l'hypothèse d'un cycle exo-érythrocytaire « secondaire ». Ce n'est que beaucoup plus tard que ce phénomène fut démontré expérimentalement. Ainsi, un stade « dormant » de la  
30 forme hépatique, l'hypnozoïte, a été décrit en 1980 (Krotoski et al., 1980) pour *P. cynomolgi*, l'équivalent pour le primate de *P. vivax*. Cette forme est responsable des rechutes après une longue période d'absence de parasite dans le

## 6

sang/d'exposition aux parasites, qui sont caractéristiques de *P. vivax* et *P. ovale*. Récemment, un stade supplémentaire, le mérophore, une forme provenant des formes sanguines, a été observé dans la rate et les ganglions lymphatiques de souris infectées par les *Plasmodium* murins (*P. yoelii*, *P. chabaudi* et *P. vinckei*) (Landau et al., 1999). Cette étape du cycle reste encore à être décrite dans les espèces plasmodiales humaines.

Le cycle du parasite, comme il est conçu aujourd'hui est représenté dans la figure 1 (Les parties entre parenthèse sont des formes décrites pour d'autres espèces de *Plasmodium*, mais pas pour *P. falciparum*).

10

#### Les moyens de lutte contre l'extension du paludisme : nécessité du développement d'un vaccin

Les deux découvertes de l'agent causal de la maladie et du vecteur de la maladie ont permis dès le début du 20<sup>e</sup> siècle d'élaborer des moyens de défense rationnels contre le paludisme en attaquant le parasite chez l'hôte vertébré par des médicaments ou en ciblant le moustique vecteur soit avec des larvicides, soit avec des insecticides, soit par l'utilisation de moustiquaires. Le succès de l'élimination de la maladie dans les zones tempérées après la 2<sup>ème</sup> guerre mondiale, a mené vers une mise en place d'un programme d'éradication du paludisme qui a culminé dans les années 60 où le DDT a été le principal outil contre les moustiques et la chloroquine a été la principale drogue contre le parasite. La taille des territoires endémiques ciblés a ainsi été réduite (quasi éradication dans les zones tempérées) et le nombre de personnes affectées par la maladie a initialement diminué. Cependant les succès dans les zones tropicales furent de courte durée. Le nombre de malades n'a pas cessé de croître d'une part à cause de l'augmentation démographique, d'autre part en raison de l'apparition de résistances aux insecticides et aux drogues disponibles.

L'apparition de ces résistances a nécessité de s'orienter vers d'autres moyens de lutte. L'existence d'une immunité naturelle induite par l'exposition aux parasites et l'observation que le transfert passif d'immunoglobulines de personnes immunes diminue la parasitémie ainsi que l'immunisation efficace et stérilisante par des sporozoïtes atténués par irradiation ont rendu raisonnable

30

l'argument d'un vaccin contre le paludisme, dont le développement constitue alors une priorité de santé publique au niveau mondial.

#### **A la recherche de l'immunité salvatrice**

- 5 L'immunité naturelle contre le paludisme est caractérisée par un développement très lent et le fait qu'elle n'aboutit pas à une protection stérilisante. Dans les zones hyperendémiques, l'acquisition de l'immunité naturelle contre les stades érythrocytaires se manifeste chez les enfants d'abord par une tolérance au parasite (immunité anti-toxique) puis avec l'âge par une  
10 diminution de la charge parasitaire dans le sang (immunité anti-parasitaire).

- Ces observations, faites au cours des études épidémiologiques ont été confirmées par des infections expérimentales. La malarariothérapie appliquée aux personnes atteintes de neurosyphilis (Boyd and Coggeshall, 1938; Cluca et al., 1943; James, 1936), a permis de définir des paramètres qui interviennent  
15 dans l'acquisition de l'immunité dans des expériences étroitement contrôlées. Il a ainsi été montré que l'immunité acquise était d'une part dépendante de l'espèce et de la souche et d'autre part différait en fonction du stade du cycle parasitaire infectant. Jusqu'à présent, les mécanismes précis de l'immunité anti-paludéenne restent à élucider.

- 20 Du fait que les signes cliniques et la transmission sont uniquement dûs aux stades sanguins et que ceux-ci sont les plus accessibles aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, la plupart des études vaccinales ont concerné ces stades. Une trentaine d'antigènes exprimés dans les parasites érythrocytaires ont été identifiés, particulièrement par des anticorps monoclonaux et considérés en tant  
25 que candidats vaccins. Toutefois les essais d'induction d'immunité protectrice par les rares antigènes testés chez l'homme sont demeurés infructueux jusqu'à présent.

- La première immunisation avec les stades pré-érythrocytaires a été tentée sans succès par les frères Sergent en Algérie (Sergent and Sergent, 1910). La  
30 capacité de protéger de façon stérilisante (absence de toute parasitémie sanguine) n'a été obtenue que par l'immunisation avec des sporozoïtes atténués par irradiation. Cette approche fut initiée par des études chez l'oiseau avec des

sporozoïtes irradiés par des rayons U.V. (Mulligan et al., 1941), et a été reprise 20 ans plus tard avec des plasmodies de rongeur en utilisant des sporozoïtes irradiés par des rayons X et plus tard des rayons  $\gamma$ , dont la dose peut être contrôlée plus facilement (Nussenzweig et al., 1967; Richards, 1968); l'immunité

5 peut être maintenue par un rappel de sporozoïtes non-atténués (Orjib et al., 1982). Chez l'homme, une telle protection a aussi été obtenue (Clyde, 1975; McCarthy and Clyde, 1977), toutefois elle n'est induite qu'après un très grand nombre d'inoculations par des sporozoïtes irradiés si bien qu'une telle procédure vaccinale ne peut être appliquée à grande échelle.

10 Pendant longtemps, on a cru que la protection était corrélée avec un phénomène observé lorsque l'on incube les sporozoïtes avec du sérum immun, la CS (Circum sporozoïte) précipitation (Vanderberg et al., 1969). La protéine majoritaire reconnue par ce sérum, la protéine CS, a donc été considérée responsable de cette immunité. Depuis elle a été à l'origine de multiples études

15 vaccinales dans beaucoup de modèles expérimentaux. Or jusqu'à présent aucune de ces études n'a pu reproduire une immunité aussi solide que celle induite par des sporozoïtes irradiés.

Une évaluation critique des résultats expérimentaux précédents a mené à postuler que c'était le stade hépatique et non le sporozoïte qui était à l'origine de

20 l'immunité stérilisante (Druihe and Marchand, 1989). L'indice principal était le fait que la protection ne pouvait être induite que par l'inoculation des sporozoïtes viables, par voie intraveineuse, capables d'envahir un hépatocyte et de s'y développer, et que les formes hépatiques issues de sporozoïtes irradiés persistaient (Ramsey et al., 1982). De plus, une élimination des stades

25 hépatiques provoquait une susceptibilité aux infections par des sporozoïtes chez des animaux préalablement protégés (Londono et al., 1991; Scheller and Azad, 1995).

Le stade hépatique possède des caractéristiques uniques. L'hépatocyte est une cellule nucléée métaboliquement très active et exprime des molécules du

30 complexe majeur d'histocompatibilité. La schizogonie hépatique entraîne la formation d'entre 10.000 et 30.000 mérozoïtes alors que 4 à 32 mérozoïtes sont libérés par un schizonte sanguin. Les mérozoïtes issus de ces deux stades ont

des différences morphologiques, mais on ne sait pas s'il existe des différences fonctionnelles ou moléculaires, car seuls les mérozoïtes sanguins ont pu être extensivement étudiés.

- 5 Du fait que dans le foie, seuls quelques hépatocytes sont infectés et qu'*in vitro*, les techniques de culture restent délicates et difficiles, ceci a constitué un obstacle majeur au développement des connaissances sur le stade hépatique et à la recherche d'antigènes exprimés à ce stade.

#### **Criblage d'antigènes spécifiques de stade**

- 10 La première stratégie pour établir l'expression spécifique de stade est la génération de banques d'ADN complémentaires à partir d'ARN messagers des différents stades. Ceci a été accompli plusieurs fois aux stades sanguins (Chakrabarti et al., 1994; Watanabe et al., 2001) et plus récemment une fois au stade sporozoïte (Fidock et al., 2000). Cependant, cette approche n'est pas
- 15 possible pour le stade hépatique des plasmodies humains. Un autre moyen est la génération d'anticorps spécifiques dans des modèles animaux. Ceci est facile aux stades érythrocytaires mais pour le stade hépatique, plusieurs tentatives ont échoués, car les injections de stades hépatiques de *P. falciparum* n'ont induit que très peu d'anticorps dans les souris. Une dernière approche est le criblage
- 20 immunologique basé sur l'utilisation d'anticorps d'individus naturellement immunisés. Cette approche a permis de mettre en évidence pour la première fois que d'autres antigènes que la CS étaient présents à la surface du sporozoïte (Galey et al., 1990).

- 25 **Stratégie élaborée dans le laboratoire d'identification d'antigènes exprimés aux stades pré-érythrocytaires.**

- Afin de contourner la difficulté de criblage aux stades pré-érythrocytaires, une stratégie de criblage d'antigènes de *P. falciparum* potentiellement exprimés dans les stades sporozoïte et hépatique a été développée (Marchand and
- 30 Druilhe, 1990).

Le principe était de chercher des individus chez lesquels la réponse immune prédominante était contre les stades pré-érythrocytaires. Nous avons



ainsi obtenu des sérums d'individus (sérums PM) vivant en zone d'endémie depuis plus de 20 ans et n'ayant jamais eu d'accès cliniques car ils étaient en permanence sous traitement prophylactique à la chloroquine (schizonticide efficace contre les stades sanguins, mais sans effet sur les stades hépatiques).

- 5 Les sérums correspondants ne reconnaissaient en effet que très faiblement des stades sanguins en Western Blot et en IFI (titres inférieurs à 1/200), tandis que les titres contre les stades sporozoïtes et hépatiques du parasite étaient compris entre 1/3200 et 1/6400 en IFI et ils marquaient plusieurs polypeptides sur des extraits protéiques de sporozoïtes de *P. falciparum*; il s'agissait donc de sérums
- 10 contenant des anticorps spécifiques des antigènes exprimés aux stades pré-érythrocytaires.

- Ces sérums ont été utilisés pour cribler une banque génomique de *P. falciparum* (construite par Odile Mercereau Puljalon). L'ADN génomique issu du clone parasitaire T9-86 a été méthylé et digéré par la Dnase 1, et les fragments
- 15 d'une taille allant de 200 à 2500 paires de bases ont été introduits dans le site *EcoR1* du phage  $\lambda$ gt11 (Guérin-Marchand et al., 1987).

- Parmi les 7 millions de fragments d'ADN générés, 2000 clones produisant un antigène recombinant reconnu par des sérums hyper immuns (SHI) d'individus immuns vivant en zone d'endémie, ont ensuite été criblés avec les
- 20 sérums PM. 120 clones ont ainsi été sélectionnés et l'expression de stade des antigènes correspondants a été déterminée par des tests d'IFIs, avec des anticorps humains immunopurifiés sur chaque protéine recombinante, sur les sporozoïtes, les stades hépatiques et les stades sanguins de *P. falciparum*, *P. yoelii* et parfois avec *P. berghei* et *P. vivax*.

- 25 Le premier antigène à être étudié et contre lequel les réponses humorales étaient les plus élevées dans plusieurs sérums d'individus vivant dans une zone d'endémie était le Liver Stage Antigen 1, LSA-1 (Guérin-Marchand et al., 1987). Il demeure le seul antigène caractérisé à être exprimé uniquement au stade hépatique.

- 30 A la suite du LSA-1, 3 antigènes STARP, SALSA et LSA-3 ont été sélectionnés à partir de divers critères et caractérisés au niveau moléculaire (Bottius et al., 1996; Daubersies et al., 2000; Fidock et al., 1994a), et

## 11

immunologiquement par L. Benmohammed , K. Brahmi, J.P. Sauzet et B. Perlaza. (BenMohamed et al., 1997; Perlaza et al., 1998; Sauzet et al., 2001). Ces antigènes sont exprimés aussi bien à la surface du sporozoïte qu'au stade hépatique.

- 5 Le LSA3 est l'unique antigène reconnu différenciellement par des sérums de volontaires ou de chimpanzés protégés par l'immunisation avec des sporozoïtes irradiés. Il est le seul à avoir induit une protection stérilisante et de longue durée chez des chimpanzés (Daubersles et al., 2000), et sera bientôt testé dans des essais cliniques de phase I et II.

10

### Objectifs

- En raison des ces résultats encourageants, il nous a semblé nécessaire de poursuivre la caractérisation des autres antigènes contenus dans la sélection PM, exprimés soit à la surface du sporozoïte, soit dans le stade hépatique, soit les
- 15 deux. L'histoire des essais vaccinaux des stades érythrocytaires nous avait appris qu'il pouvait être risqué de se focaliser sur le premier antigène identifié souvent par des critères non optimaux, alors que le génome de *P. falciparum* compte près de 7000 gènes. Malgré les bons résultats pré-cliniques obtenus avec LSA3, on ne peut évidemment pas être certain aujourd'hui que cet
- 20 antigène suffise à lui seul à induire une protection solide chez l'homme et il demeure possible qu'il faille le combiner avec d'autres antigènes pré-érythrocytaires ayant un potentiel protecteur. Nous avons choisi des clones présentant des caractéristiques différentes afin de les caractériser, les exprimer puis de tenter de définir leur rôle dans l'immunité induite contre le parasite. Huit
- 25 clones ont été sélectionnés par un ou plusieurs critères avec des objectifs différents afin d'obtenir des antigènes présentant des propriétés distinctes (tableau 11).

- Toutefois, tous les clones sélectionnés partagent des propriétés essentielles telles que la présence de l'antigène correspondant (détectée par IFI)
- 30 au stade hépatique, la reconnaissance constante des antigènes par des sérums d'individus immuns vivant en zone de forte endémie et la reconnaissance de sporozoïtes provenant de souches différentes de parasites par des anticorps

## 12

spécifiques, afin d'évaluer indirectement la constance d'expression c'est à dire, une variabilité minimale de l'antigène. Bien entendu, les résultats disponibles à l'époque suggéraient qu'il s'agissait de 8 gènes nouveaux n'appartenant ni à la protéine CS ni aux 4 autres antigènes identifiés dans notre sélection

- 5 Lorsque nous avons pu détecter une réactivité croisée avec le parasite murin *P. yoelii*, un phénomène curieusement observé beaucoup plus souvent qu'avec *P. berghei*, nous n'avons non seulement prévu l'étude de l'induction de réponses immunes chez les souris mais en plus la mesure de l'efficacité de cette
- 10 réponse par infection avec les sporozoïtes du parasite murins et suivi de l'apparition de la parasitémie sanguine. Ces infections pourraient indiquer des rôles potentiels des antigènes étudiés et éventuellement donner un élément supplémentaire d'information pour la sélection de candidats vaccins.

- En premier lieu, nous avons attribué à chaque fragment son gène correspondant. En fonction de ces données, les études ont été différentes selon
- 15 qu'il s'agissait de molécules déjà caractérisées ou de la caractérisation de molécules jusqu'ici non-identifiées.

## 2) MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Techniques de biologie moléculaire

#### 20 2.1.1. Souches bactériennes

DH5 $\alpha$ : *supE44  $\Delta$ lacU169( $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 gyrA96 thi- 1 relA1.*

#### 2.1.2. Souches de parasites:

- 25 NF54 issue d'un isolat de malade européen infecté en Afrique (ATCC MRA151) (Walliker et al., 1987).

3D7, la souche référence utilisée dans le projet genome, est un clone issu de la souche (ATCC MRA151) (Walliker et al., 1987).

- T9.96, une souche provenant d'un patient thaïlandais ATCC : MRA153 ,
- 30 (Thaithong et al., 1984)

Pour les tests de polymorphisme, des souches distinctes ont été employées: B1 (Brésil); F32, D7, D28, D50 issues de la Tanzania; D28 du

Sénégal, D41 de l'Inde, D51 de Myanmar, L1 de Libéria, H1 de Honduras, Mad20 de Papua New Guinea, et PA de Palo Alto, d'Amérique du Sud Ouest. (Stricker et al., 2000).

Les sporozoïtes sont issues de la souche NF54 et obtenus par passage  
5 dans des *Anopheles Gambiae* REF

### 2.1.3. PCR à partir d'extraits de phages ou d'ADN de phages

Le Expand High Fidelity Kit (Mannheim Boehringer, Allemagne) a été  
utilisé comme indiqué par le fournisseur avec 2 mM de  $MgCl_2$ , 3.5 unités de Taq  
10 polymérase, 0.2 mM de desoxyribonucléotides (dNTP), 50 nM des amorces 21D  
en 5' (CCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGG) et 28D en 3'  
(GGTAGCGACCGGCGCTCAGCTGG) et 2  $\mu$ l d'ADN purifié ou d'extrait de  
phage. La réaction a comporté une dénaturation initiale de 2 minutes à 94 °C,  
suivie par 35 cycles consécutifs de 15 secondes de dénaturation à 94 °C, 30  
15 secondes d'hybridation à 50 °C, et 2 minutes d'élongation à 68 °C. Le circuit  
cyclique a été suivi par une incubation à 68 °C pendant 5 minutes.

### Sous-clonage dans les vecteurs histidine, pNAK et Topo

Selon la qualité du produit d'amplification des phages, trois procédures ont  
20 été employées:

Les produits PCR présentant un smear ou un rendement très petit et étant  
de plus petite taille quasi impossible à détecter en digérant l'ADN du phage  
correspondant, ont été clonés par l'intermédiaire d'un vecteur permettant un  
clonage direct du produit PCR sans digestion successive d'une enzyme de  
25 restriction à l'aide du kit de TopoTA Cloning (Invitrogen, Les Pays-Bas). Le  
clonage Topo a aussi été effectué pour les fragments dont nous voulions  
uniquement déterminer la séquence.

Les produits PCR de tailles inférieures à 1 kbp ont été digérés, précipités  
à l'éthanol, et resuspendus dans la moitié du volume initial d' $H_2O$ , puis digérés  
30 par 10 U de l'enzyme de restriction *EcoR*1, pendant 1 heure à 37 °C, tirés sur un  
gel d'agarose à 2 %, purifiés sur gel par la procédure de gel extraction kit de  
Qiagen, donnant un volume de 50  $\mu$ l.

## 14

Les produits PCR peu abondants de grande taille (supérieurs à 1000 bp) ont été isolés à partir de l'ADN de phage purifié par une digestion avec *EcoR1*, puis par extraction de l'insert du gel d'agarose.

5 Etude du polymorphisme du gène dans des souches parasitaires différentes.

Les amorces suivantes ont été utilisées pour identifier les polymorphismes en taille de régions spécifiques correspondant aux antigènes étudiés.

747-1: AAAAGTGATGATAGAAATGCTTGTG (5'  
 10 747-2: TTTTGTTGATCTTACTTATTTACC (3')  
 772-1: CGGAATCAGGTTTAAATCCAAC (5')  
 772-2: AGATCGTTTTTCATCAGGGGG (3')

La réaction cyclique a été effectuée avec un programme comportant une  
 15 étape initiale d'une dénaturation à 94°C pendant 15 secondes, suivie par 39 cycles comprenant une dénaturation à 94°C pendant 2 minutes, une hybridation à 52 °C pendant 1 minute et une élongation à 72°C pendant 2 minutes. Une étape de 5 minutes à 72°C a terminé la réaction.

Les PCR ont été effectuées sur un Crocodile III de Appligène. Les  
 20 produits ont ensuite été analysés sur gel d'agarose.

2.1.4. Purification d'ADNPour les analyses de recombinants

Les colonies positives en PCR ont été inoculées dans 3 ml de milieu  
 25 contenant l'antibiotique correspondant au vecteur utilisé (100 µg/ml ampicilline pour Topo et Histidine, 20 µg/ml kanamycine pour le vecteur Vical) et 2 ml d'inoculum ont été utilisés dans la préparation d'ADN plasmidique avec le Qiagen Miniprep Kit. L'ADN obtenu a successivement été digéré avec les enzymes de restriction utilisées dans le clonage et soumis à une électrophorèse  
 30 sur gel d'agarose, afin de détecter l'insertion du fragment.

Pour l'isolement de fragments:

## 15

100 ml de milieu Luria Broth supplémenté en antibiotique approprié ont été inoculés avec 1 colonie de bactérie comportant le recombinant, et incubé à 37 °C sur la nuit dans un bain thermostaté en agitation vigoureuse. Le lendemain, la culture bactérienne a été récoltée et l'ADN plasmique purifié  
5 comme décrit (Qiagen maxiprep, Qiagen, Allemagne).

Pour l'immunisation de constructions ADN nu

Afin d'éliminer les endotoxines, qui sont présents dans les bactéries et qui peuvent entraîner des réponses non spécifiques lors des immunisations de  
10 souris, l'ADN des constructions a été purifié à partir de 2 l de culture de bactéries recombinantes, par Qiagen EndoFree Plasmid Giga kit (Qiagen, Allemagne).

Pour la purification d'ADN de phages recombinants

Les phages ont été réamplifiés sur des boîtes d'agarose de LB, en déposant 5 µl sur du Topagar pris avec 200 µl d'inoculum de Y1090, et en  
15 laissant à 37 °C sur la nuit.

Ensuite, une quantité plus grande a été produite en culture liquide. D'abord, une plaque piquée sur la boîte a été incubée avec 200 µl d'inoculum de Y1090, laissée à 37 °C avec agitation pendant 15 minutes. Ensuite, 5 ml de  
20 milieu sans antibiotique supplémenté avec 10 mM de  $MgSO_4$  a été ajouté, et la culture laissée en agitation pendant 4 heures, jusqu'à l'apparition de lyse. 50 µl de Chloroforme a été ajouté, et le tout centrifugé à 7000 g pendant 10 minutes. Après centrifugation, le surnageant libéré des débris cellulaires a été récupéré. Ce stock a été utilisé dans la production de 500 ml de phage en culture liquide :  
25 l'équivalent de  $7.5 \cdot 10^8$  pfu (unités formant des plaques) a été ajouté à 500 µl de cellules d'une culture inoculée sur la nuit de Y1090, et 500 µl de 10 mM  $MgCl_2/CaCl_2$ . Tout a été incubé à 37 °C 15 minutes, et ajouté à 500 ml de milieu LB sans antibiotique. La lyse des bactéries observée par l'apparition de filaments dans la culture a été suivie jusqu'à la lyse totale (4-5h). Ensuite, la culture a été  
30 centrifugée à 8000 g pendant 15 minutes à 4 °C, le surnageant récupéré, et stocké à 4 °C sur la nuit.

16

Le lendemain, la purification de l'ADN a été entreprise avec le Lambda Maxi Kit (Qiagen, Allemagne) avec des ajustements en début de protocole à cause du volume plus grand de surnageant de départ. Le culot final a été resuspendu dans 500 µl de tampon TE.

5

#### A partir de parasites

100 µl de culot de culture de globules rouges à 10 % de parasitémie, a été resuspendu dans 100 µl de PBS, pH 7,2 et purifié par le Qiaamp DNA Mini Kit (Qiagen, Allemagne). A partir de 100 µl de culot d'une culture parasitée à 10 %, on a obtenu environ 5µg d'ADN.

10

#### *2.1.5. Purification d'ARN total parasite*

Nous avons utilisé deux méthodes en fonction de la quantité d'ARN voulu. Pour des quantités importantes, la méthode décrite par (Kyes et al., 2000) a été employée, tandis que pour obtenir des préparations de quantités plus restreintes, nous avons utilisé le RNeasy kit (Qiagen, Allemagne.)

15

#### *2.1.6. RT-PCR.*

La RT-PCR a été effectuée avec le kit RT-PCR de Qiagen (Allemagne). Des amorces spécifiques pour chaque gène et situées, si possible, de telle façon que l'on puisse distinguer entre les produits issus d'amplification d'ADN génomique et d'ARN (autour des introns) ont été utilisées. Une première réaction de Transcription inverse a été effectuée à 50 °C pendant 30 minutes, puis une réaction de PCR a été effectuée, dans les mêmes conditions que celle décrites pour une PCR d'ADN de parasite avec les amorces sélectionnées, parfois suivi d'une deuxième réaction (nested PCR) avec des amorces situés dans la séquence du premier produit PCR amplifié. Cependant, la température d'hybridation varie en fonction des amorces utilisées (entre 50 et 60 °C).

25

#### *2.1.7. Purification des recombinants histidine*

30

2 l de milieu de Luria Broth additionné avec l'ampicilline à 100 ng/ml a été inoculé avec 50 ml de culture de bactérie contenant le plasmide recombinant. La

croissance des bactéries a été suivie par la mesure de la turbidité bactérienne à 600 nm et à la densité optique voulue (entre 0,5 et 1) une concentration d'IPTG variant entre 0,5 et 1 mM selon le recombinant a été ajoutée à la culture, et l'induction a duré entre 2 h et 4 h.

- 5        Ensuite les cellules ont été récoltées et le culot de bactéries resuspendu dans un tampon de 20 mM de  $\text{NaPO}_4$ , pH 7.4, et 8 M d'urée (TU) (25 ml/litre de culture bactérienne). Ensuite, la suspension de cellules a été soumise à des sonifications de 10 chocs de 1 minute chacun, et le surnageant contenant les protéines recombinantes a été récupéré par centrifugation à 10.000 g pendant
- 10    10 minutes, et filtré à 0.22  $\mu\text{m}$ . Ensuite, une étape de purification par affinité sur une colonne de Nickel a été effectuée. Une colonne de 1 ml (HiTrap, Pharmacia, Suède) a été lavée comme indiqué par le fournisseur et 1 ml de  $\text{NiCl}_2$  a été appliqué, suivi par d'autres lavages. Ensuite, la colonne a été lavée avec 5 ml de TU, et le surnageant appliqué sur la colonne. Ensuite, un lavage de 10 ml de TU
- 15    a été effectué, et le recombinant élué par un gradient croissant en imidazole, compétiteur de l'histidine. Selon le recombinant purifié, des concentrations différentes ont été employées, et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous. Ensuite, le pool de protéines a été dialysé contre un tampon L-histidine pH 6, et chromatographié sur une colonne échangeuse d'anions
- 20    (HiTrap Q, Pharmacia, Suède) afin d'éliminer une partie des Lipo Poly Saccharides (LPS) ou endotoxines qui induisent des réponses non spécifiques (Morrison and Ryan, 1987).



Tableau de purification des recombinants histidine

Recombinant	Induction <sup>1</sup>			DO après induction	Emplacement de la protéine, Poids moléculaire <sup>2</sup>	Imidazole (mM) <sup>3</sup>	NaCl (mM) <sup>4</sup>
	DO	IPTG	Temps				
747	0.5	0.5	4h	2.7	Mem, 18	50	360
772	0.5	0.5	4h	2.2	SN, 35	36	120

1 : La DO mesurée à 600 nm, La concentration en IPTG (mM) ; et le temps d'induction avant récolte.

5 2 : Après sonication, et centrifugation d'une suspension de bactéries ne contenant pas d'urée (8M) dans le tampon, le surnageant et le culot contenant les débris de membranes bactériennes ont été testés en Western blot afin de détecter où la protéine recombinante se trouvait. En présence d'urée toutes les protéines étaient solubles, et les procédures de purification ont donc été appliquées en présence de 8 M d'urée.

10 3 : La concentration d'imidazole à laquelle la protéine a été éluée sur la colonne de HiTrap-Ni

4 : La concentration de NaCl à laquelle la protéine a été éluée sur la colonne de HiTrap-Q

## 2.2. Techniques Immunologiques

### 16 2.2.1. ELISAs (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Les conditions optimales ont été déterminées avec 100 µl de solution d'antigène d'une concentration de 10, 5 ou 1 µg/ml coatés sur les plaques dans 50 mM de Carbonate pH 9.6 ou 1X PBS pH 7.4 en incubant les plaques sur la nuit à 4 °C. La saturation a été effectuée, soit en PBS supplémenté par 3 % de  
20 lait écrémé, ou 1% de BSA (albumine de sérum de veau) à température ambiante ou à 37°C pendant 2 heures. La dilution de sérums de 100 ou de 200 fois a été effectuée soit avec du PBS/lait à 1.5 % , soit avec du PBS/BSA 1%, et l'incubation a été faite à température ambiante ou à 37°C pendant 1 h.

L'incubation avec les anticorps secondaires couplés à la HRPO  
25 (peroxydase de navet) dilués au 1/2000 dans le tampon de dilution des sérums a été effectuée à température ambiante, et les révélations ont été faites à l'aide des tampons de TMB (peroxydase substrate et peroxydase solution B) (Laboratoires

Kirkegaard et Perry, USA) mélangés volume à volume immédiatement avant utilisation dont 100 µl ont été distribués dans chaque puits. Les réactions colorées en bleu ont été arrêtées en ajoutant le même volume d'une solution d'1 M d'acide phosphorique. Les réactions sont lues à 450 nm dans un lecteur Multiscan Ascent (Labsystems).

Les résultats des souris sont exprimés en Ratio (unité arbitraire par rapport aux taux des réponses dans des témoins naïfs) et dans les expériences où les taux des isotypes ont été étudiés, par rapport au Ratio des IgG totaux déterminé dans la même expérience.

#### 2.2.2. Immunopurification d'anticorps spécifiques

Pour l'immunopurification d'anticorps spécifiques contre les recombinants His<sub>6</sub>, une méthode décrite par (Brahimi et al., 1993) a été employée. 100 µl/puits de solution d'antigène dans du PBS, pH 7.2, à une concentration de 5 µg/ml ont été adsorbés sur plaques Nunc Maxisorp (Nunc, Danemark), et les plaques incubées à +4 °C la nuit. Ensuite, des sérums hyperimmuns ont été incubés à une dilution de 1/50 pendant 1 heure à température ambiante, les plaques lavées et l'élution des anticorps effectuée par ajout de glycine pH 2.5 à 0.2 M, incubation pendant 3 minutes et récupération suivie par une neutralisation du pH avec du Tris, 1M, pH 11. L'immunopurification à partir de recombinants de fusion β-galactosidase a été effectuée sur des filtres de nitrocellulose, comme décrit (Beall and Mitchell, 1986).

#### 2.2.3. SDS-PAGE et Western Blot

En fonction des échantillons à tester, des gels de pourcentage d'acrylamide (BioRad 29.1:1 ratio) variables (5, 7.5, 10 ou 12 %) ont été utilisés. Après migration en tampon Tris/glycine (pH 8.5) avec le kit minigel (Biorad, USA) les gels ont soit été colorés par bleu de Coomassie soit soumis à un transfert sur filtres de nitrocellulose (0.45 µm), dans la cellule Trans-Blot (BioRad.)

Après transfert, les protéines ont été visualisées par une coloration avec 0,2 % de rouge Ponceau dans une solution d'acide acétique (5%), puis le filtre a été saturé en TBS/lait écrémé à 5 % pendant 30 minutes. Les anticorps humains

20

immunopurifiés sans dilution, et les sérums dilués 1/100 ou 1/200 dans du TBS/lait 5%/ Tween 0,05% ont été incubés pendant 1 à 2 heures à température ambiante. Ensuite, le filtre a été lavé 3 fois 10 minutes en TBS/Tween 0,05 %, et incubé avec les antisérums couplés à la phosphatase alcaline dilués 1/5000, pendant 30 minutes. Après lavage dans le même tampon, les réactions colorées ont été produites par l'ajout de NBT (330 µg/ml) et de BCIP (165 µg/ml) (Promega, Allemagne) dilués dans du tampon Tris pH 9.

#### 2.2.4. IFI (*Immunofluorescence indirecte*)

Toutes les incubations à 37°C ont été effectuées dans une chambre humide afin d'éviter l'assèchement des tissus ou cellules à étudier. Les tampons ont été filtrés par un filtre à 0,22 µm afin d'éviter des contaminations par d'autres microorganismes et des bruits de fond.

##### 15 a) Stade sporozoïtes

Après dissection des glandes salivaires de moustiques infectés avec le parasite, les sporozoïtes ont été fixés avec 0.01 % de glutaraldehyde en PBS et lavés soigneusement en PBS.

Afin d'étudier le marquage uniquement en surface des sporozoïtes, (Galey et al., 1990) a développé une technique permettant une fixation « humide » avec une suspension de sporozoïtes attachés à la polylysine. Les lames de titration (PolyLabo, France) ont été coatées avec 1 µl d'une solution de 50 mg/ml de polylysine, puis laissées sécher une nuit à 37°C. 1 µl d'une suspension de sporozoïtes (20 /µl) a été déposée sur chaque puits, et incubé dans une chambre humide à 4°C sur la nuit. La détection d'une présence intra-parasitaire a été faite par fixation des sporozoïtes dans l'acétone.

##### b) Stade hépatique

Les coupes fixées au Carnoy et paraffinées ont été préparées par 3 bains de Xylène de 10 mn chacun, 3 bains d'alcool absolu de 5 mn chacun, 2 bains d'eau distillée de 5 mn chacun, et séchées à l'air libre.

Ensuite, les coupes ont été réhydratées pendant 10 mn dans du PBS pH 7.4 filtré. Les coupes à congélation ont été fixées 10 minutes en acétone.

#### c) Stade sanguin.

- 5 Les frottis sanguins ont été fixés 10 minutes à l'acétone, et des cases pour chaque échantillon à tester ont été délimitées en dessinant des bords avec un marqueur Pentel-rouge sur le frottis.

- La suite de la technique a été identique pour les trois stades: Après fixation, les anticorps à tester (dilués dans du PBS) ont été déposés sur chaque puit, coupe ou case, et la lame incubée à 37°C en chambre humide pendant 1  
10 heure. Les lames ont été lavées 3 fois 10 minutes dans du PBS 1X, puis incubées avec un anti-IgG anti-humain ou souris (selon les anticorps spécifiques utilisés), couplé à la fluorescéine (Alexis) dilué 1/200 dans du PBS et du bleu d'Evans 1/50000, incubées 30 minutes à 37°C en chambre humide, lavées trois  
15 fois en PBS 1X, et couvertes par une lamelle après qu'une goutte de tampon glyciné (PBS 30 % glycérol) ait été déposée. La lecture de la lame a été effectuée au microscope à U.V (Olympus, BH2))

#### 2.2.5. *Immunisations de souris*

##### 20 1) Par les recombinants histidines

Les protocoles a, b et c ont essentiellement été appliqués pour obtenir des sérums spécifiques, tandis que les protocoles b, c et d ont été employés afin d'effectuer des infections d'épreuve par *P. yoelli*.

##### 25 a) Adjuvant IFA/Alum

Des souris BALB/c femelles de 6 semaines ont reçu 1 première injection intra-péritonéale de 500 µl, avec 1 mélange de 20 µg d'antigène (His<sub>6</sub>-249, His<sub>6</sub>-680, His<sub>6</sub>-747, His<sub>6</sub>-772), 2 mg/ml d'Alum (Al(OH)<sub>3</sub>), et de l'Adjuvant incomplet de Freund (AIF), volume dans volume, supplémenté avec 0.9% de NaCl.

- 30 Les 2 injections suivantes, chacune à 15 jours d'intervalle, ont été effectuées avec la même quantité d'antigène dans le même volume, mais sans AIF, et avec de la méthiolate, un conservateur, à 0.05%.

## 22

Les souris ont été prélevées (500 µl) avant l'immunisation 2 semaines, 1 mois et 6 semaines après la première immunisation, sur EDTA et les plasma récupérés et stockés à -20°C.

## 5 b) CFA

Des souris BALB/c femelles de 6 semaines ont reçu 3 injections sous-cutanées tous les 15 jours à la base de la queue d'un mélange constitué par 100 µl d'adjuvant complet de Freund et de 10 µg d'antigène (His<sub>6</sub>-114 ou His<sub>6</sub>-662) dans 100 µl de PBS. 1 semaine après la troisième injection, les sérums des  
10 souris ont été prélevés et les réponses testés en ELISAs contre le recombinant et en IFI sur les sporozoïtes. 18 jours après la dernière injection, les souris ont subi une infection d'épreuve par des sporozoïtes de *P. yoelii*.

## c) SB2SA (Adjuvant Smith and Klein Beecham)

15 Des souris C3H femelles de 7 semaines ont reçu trois injections sous-cutanées à la base de la queue de 100 µl d'un mélange constitué par 57 µl d'adjuvant mélangé avec 43 µl d'antigène (His<sub>6</sub>-249, His<sub>6</sub>-747 ou His<sub>6</sub>-772) correspondant à 10 µg, les injections étant espacées de 3 semaines chacune. 10  
20 jours après la dernière immunisation, les souris ont été prélevées et les sérums correspondants récoltés.

## d) Microparticules

26 Les solutions d'antigènes (His<sub>6</sub>-249, His<sub>6</sub>-747 ou His<sub>6</sub>-772) ont été adsorbées sur des microparticules en polystyrène de 0.5 µm de diamètre (Polysciences Inc, USA) par incubation à 37 °C en agitation pendant 4 heures dans une solution de glycine, pH 8.0. L'adsorption de l'antigène a été vérifiée par la capacité des micro-billes d'agglutiner avec un sérum spécifique à l'antigène adsorbé. Des souris C3H femelles de 7 semaines ont reçu trois injections sous-  
30 cutanées à la base de la queue de 100 µl d'un mélange constitué de microbilles coatées avec l'antigène correspondant à 10 µg, les injections étant espacées de 3 semaines chacune. 10 jours après la dernière immunisation, les souris ont été prélevées et les sérums correspondants récoltés.

## 2. Par les recombinants ADN

Des souris BALB/c et C3H de 6 semaines ont été injectées 3 fois à 8 semaines d'intervalle par voie intramusculaire avec 100 µl d'antigène (pNAK114, pNAK249, pNAK438, pNAK571, pNAK747, pNAK772) dans du PBS pH 7.4, puis une 4<sup>ème</sup> fois 12 semaines après la 3<sup>ème</sup> injection. Les prélèvements de sang ont été effectués 1 semaine après la 3<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> immunisation sur EDTA, et les sérums récoltés après une incubation du prélèvement la nuit à 4°C.

Les rates de 3 souris /groupe ont été prélevées après la 4<sup>ème</sup> immunisation, et les stimulations des réponses cellulaires étudiées. Après un 5<sup>ème</sup> boost, 8 semaines après la 4<sup>ème</sup> injection, les souris ont subi une infection d'épreuve par des sporozoïtes de *P. yoelli*.

### *2.2.6. Infection d'épreuves par sporozoïtes et par stade sanguin*

Les sporozoïtes issus de moustiques *Anopheles stephensi* infectés par le clone 1.1 de *P. yoelli yoelli* ont été obtenus par une méthode (Ozaki et al., 1984) qui consiste en l'isolement de la cage thoracique du moustique et l'obtention par centrifugation à travers de la laine de verre des sporozoïtes, qui ont été lavés par des resuspensions successives en PBS après centrifugation.

Les souris ont été infectées par des sporozoïtes de *P. yoelli* par voie rétro orbitale avec 150 à 200 sporozoïtes (200 µl/ injection), et la parasitémie suivie par des frottis du jour 3 suivant l'infection jusqu'au 12<sup>ème</sup> jour post-infection, aussi bien sur les animaux immunisés que sur des souris naïves infectées par le même lot de sporozoïtes.

Des stades sanguins prélevés sur d'autres souris infectées par *P. yoelli* ont été lavés dans du PBS, et l'équivalent de  $5 \times 10^4$  parasites ont été injectés par voie intrapéritonéale.

### *2.2.7. Étude des réponses cellulaires.*

Afin d'étudier aussi bien l'induction de prolifération de cellules-T spécifiques ainsi que la sécrétion de cytokines capables de stimuler la réponse

24

immune, nous avons étudié la stimulation de splénocytes de souris par les antigènes et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par ces cellules.

#### 1-Proliférations de lymphocytes T

5 Les rates ont été prélevées sur les souris, les suspensions de splénocytes ont été lavées deux fois dans du RPMI 1640 (Gibco, France) et les cellules resuspendues à une concentration finale de  $5 \times 10^6$  cellules /ml dans du RPMI  
10 supplémenté avec 100 U/ml pénicilline, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoéthanol, 1,5% sérum de veau fœtal (SVF) et 0,5 % de sérum de souris normal. 100 $\mu$ l/puits de chaque suspension a été distribuée dans des  
plaques de 96 puits à fond rond (Costar, USA) et les protéines recombinantes à tester ont été ajoutées à une concentration de 50 mg/ml. Ces tests ont été  
effectués en triplicate. Après 48 h d'incubation, (37 °C avec 5 % de CO<sub>2</sub>),  
50 $\mu$ l/puit de surnageant de culture a été prélevé et stocké à -70 °C avant la  
15 détermination de titres d'IFN- $\gamma$ . 50  $\mu$ l/puit de surnageant a été prélevé pour dosage de cytokines. Afin de détecter la réplication d'ADN due à une stimulation  
de division, 50  $\mu$ l d'une solution de Thymidine tritiée (<sup>3</sup>H) (Amersham Life Science, England) à 1 $\mu$ Ci/puit a été ajoutée durant les 12 dernières heures  
d'incubation. Les cellules ont été récoltées dans un récolteur de cellules  
20 automatique (Skatron Inc, Sterling, VA, USA), et l'incorporation de Thymidine <sup>3</sup>H quantifiée par scintillation. Les résultats sont exprimés en Index de Stimulation (I.S.) et la prolifération a été considérée comme positive, lorsque le S.I. est au  
dessus de 2.

#### 25 2- Détection de sécrétion d'interféron $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )

Les titres d'IFN- $\gamma$  dans les surnageants de culture ont été déterminés par  
un méthode d'ELISA à double capture. Des plaques Maxisorp (Nunc, Danemark)  
à fond plat ont été coatées par un anticorps monoclonal de rat anti- IFN- $\gamma$  de  
souris primaire (R4-6A2) (Pharmingen, San Diego, CA) dilué dans un tampon de  
30 0.1 M de carbonate, pH 9.6, et laissé sur la nuit à 4 °C. Entre chaque étape de la  
procédure, les plaques ont été lavées plusieurs fois avec du tampon PBS  
supplémenté avec 0,05 % Tween (PBS-T). Ensuite, les plaques ont été saturées

avec 3% d'albumine de sérum de veau (BSA, Sigma Chemicals, St Louis, USA) dans du PBS-T. Des surnageants non-dilués ont été ajoutés aux puits et les plaques incubées sur la nuit à 4°C, suivi par une incubation d'1 h à température ambiante avec un anticorps monoclonal rat anti-souris IFN- $\gamma$  secondaire biotinylé (XMG1.2, Pharmingen, San Diego, CA) dilué dans du PBS-T. Les étapes de marquage avec des anticorps couplés à la peroxidase sont identiques à celles utilisées dans la technique de l'ELISA. (A.2.1)

### 3-Détection de cellules sécrétrices d'IFN- $\gamma$ par Elispot

10 Le nombre de cellules sécrétrices d'IFN- $\gamma$  a été déterminé dans des splénocytes non stimulés 40 heures après qu'elles soient fraîchement isolées et incubés avec les antigènes. Des plaques de microtitrage (Multiscreen-HA, plaque stérile, Millipore) ont été coatées par 50  $\mu$ l d'une solution contenant 5  $\mu$ g/ml d'anticorps anti-IFN- $\gamma$  (18181D, Becton Dickinson Co). Après une incubation sur

15 la nuit à 4 °C, les puits ont été lavés et saturés par une solution de 5 % de SVF. Des suspensions de cellules de  $5 \times 10^5$  cellules/puits ont été incubées avec l'antigène à 50

$\mu$ g/ml dans un volume total de 200  $\mu$ l pendant 40 h, à 37 °C dans une atmosphère humidifiée de 5 % de CO<sub>2</sub>. Les plaques ont ensuite été lavées 3 fois

20 avec du PBS-T et 3 fois avec du PBS seul et les puits ont alors été coatés par 50  $\mu$ l de solution d'anticorps anti-souris IFN- $\gamma$  biotinylé (Becton Dickinson Co, USA) dilué au 1/200 et incubé sur la nuit à 4 °C. Les plaques ont ensuite été lavées de la même façon que précédemment, avant un ajout de 50  $\mu$ l par puit de phosphatase alcaline couplée à la streptavidine (Boehringer-Mannheim,

25 Allemagne) à une dilution de 1/2000 dans du PBS. Après 1 h d'incubation, et lavage des plaques, des spots ont été détectés par développement d'une réaction colorée avec les réactifs BCIP/NBT à 50  $\mu$ g/ml à l'endroit où des cellules individuelles ont sécrété de l'IFN- $\gamma$ . Les résultats sont exprimés comme le nombre de cellules formant des spots par rapport aux  $5 \times 10^6$  splénocytes.



**2.2.8. Sérums et cellules****D'individus naturellement exposés au parasite.**

10 sérums provenant d'adultes vivant dans une forte zone d'endémie (Côte d'Ivoire) et naturellement protégés ont été employés dans des études d'ELISA et des immunopurifications d'anticorps spécifiques aux antigènes étudiés.

Des sérums provenant d'individus de deux tranches d'ages allant de 0 -9 ans ou au dessus de 12 ans, ont été sélectionnés des Villages Ndiop et Dielmo (Rogier and Trape, 1995; Trape et al., 1994). Ndiop est situé dans une zone d'endémie qui compte environ 20 piqûres infectieuses/an, et Dielmo, dans une zone qui compte 160 piqûres infectieuses/an. Chaque sérum dans une des deux régions correspond en age et en sexe à un sérum de l'autre région.

**D'animaux ou d'humains immunisés avec des sporozoïtes irradiés.**

Deux chimpanzés ont été immunisés soit avec des sporozoïtes irradiés à 18 kRad, soit à 30 kRad par 4 injections de  $5 \times 10^6$  sporozoïtes chacune par voie intravéneuse. Les 3 premières immunisations ont été effectuées avec 1 mois d'intervalle, tandis que la 4<sup>ème</sup> a été effectuée 4 mois après la 3<sup>ème</sup>. Leur sérum et les cellules du sang périphérique ont été étudiés dans des tests de réponses cellulaires et de réponses humorales après 3 immunisations. Les deux animaux ont été infectés par l'injection intravéneuse de  $4 \times 10^4$  sporozoïtes (faible dose) chacune de *P. falciparum* et seulement le chimpanzé immunisé avec les sporozoïtes irradiés à 18 kRad a été protégé (n'a pas développé de parasitémie sanguine)

Deux humains immunisés par le même moyen, ont reçu un rappel avec un nouveau lot de sporozoïtes irradiés, et les cellules du sang périphérique ont été étudiées dans des tests d'Elispot.

De plus, le sérum de 4 humains immunisés avec des sporozoïtes irradiés a été à notre disposition.

D'individus exposés différemment au parasite

- Nous avons à notre disposition des sérums de 8 individus exposés naturellement au parasite mais sous traitement de chloroquine permanent, ce qui élimine les stades sanguins à une forme très précoce et des sérums de 5
- 5 Individus accidentellement infectés par la transfusion de sang infecté par *P. falciparum*.

3) RESULTATS3.1: Example 1

- 10 Identification de deux antigènes nouveaux DG47 et DG772 de *P. falciparum* reconnus par des volontaires immunisés avec des sporozoïtes irradiés

- Les clones DG 747 et DG772 ont été sélectionnés non seulement à cause des critères initiaux posés (détection sur les sporozoïtes et le stade hépatique, ainsi qu'une reconnaissance par des sérums hyperimmuns), mais parce que
- 15 plusieurs caractéristiques supplémentaires nous ont intéressés : le DG747 n'avait aucune réactivité croisée avec d'autres protéines de la banque PM, et le DG772 n'avait qu'une seule réactivité croisée, avec LSA1, le seul antigène identifié comme exprimé uniquement au stade hépatique de *P. falciparum*. De plus, des anticorps spécifiques des deux protéines marquaient des sporozoïtes de *P. yoelii*.

- 20 Un séquençage initial a révélé que ces deux clones contenaient des inserts appartenant à des gènes jusqu'ici inconnus, mais dont la séquence était disponible sur les bases de données du génome de *P. falciparum*. Nous nous sommes donc consacrés au travail de la caractérisation moléculaire d'expression du stade, de la conservation du gène, ainsi qu'à un travail de caractérisation
- 25 Immunologique (antigénicité, immunogénicité) de ces nouveaux antigènes. Les résultats ont montré que a) ces deux antigènes induisent une réponse immune chez des individus ou des animaux uniquement exposés aux stades pré-érythrocytaires aussi bien artificiellement (par immunisation) que naturellement (sur le terrain), b) qu'ils sont reconnus par des sérums d'individus naturellement
- 30 exposés au cycle entier du parasite, aussi bien dans des zones de faible que de forte endémie. De plus, nous avons évalué chez la souris leur potentiel immunogène et protecteur par l'immunisation et l'infection d'épreuve par *P. yoelii*.

### 3.1. Analyse des séquences

DG747 code pour un polypeptide de 59 acides aminés dont les 40 acides aminés (aa) C-terminaux font partie d'une structure répétitive de 5 x 8 aa riches en arginine et en lysine. Cette séquence est identique aux aa 81-140 du gène PFB0155c (1524 pb, 508 aa) situé sur le chromosome 2 (figure 3.1a). Ce gène qui code pour une protéine putative (Gardner et al., 1999), ne comporte ni introns, ni peptide signal prédits, ni de régions homologues à d'autres protéines qu'elles soient de *Plasmodium* ou d'autres organismes. La protéine correspondante a une masse moléculaire théorique de 59 kDa, et un point isoélectrique neutre (7.5), mais certaines régions ont des pI très variables, par exemple la région retrouvée dans DG747 a une charge positive à pH neutre.

DG772 contient un insert de 333 pb, qui sont traduits en 111 aa contenus dans un cadre de lecture ouvert. Ce polypeptide correspond à la région des aa 1146-1256 d'une protéine de 1493 acides aminés codée par un gène situé sur le chromosome 1 (figure 3.1b). La masse théorique de la protéine est de 173 kDa et le point isoélectrique est de 5.05. La protéine est constituée en majorité d'acides aminés polaires et ne contient pas de sites hydrophobes, à part dans la partie N-terminale, où il pourrait y avoir un site d'ancrage de GPI. Le gène ne contient pas de répétitions et la séquence nucléotidique traduite a une forte homologie avec les protéines de la famille « EBP » (Adams et al., 1992), c'est-à-dire avec des régions 5'cys et 3'cys qui sont caractéristiques de cette famille.

### 3.2. Expression de stade et conservation du gène

Afin d'évaluer plus précisément l'expression de stade des deux protéines, nous avons utilisé les techniques d'IFI et de Western blot sur des stades différents de *P. falciparum* et sur les parasites murins *P. yoelli* et *P. berghei*.

La surface des sporozoïtes de *P. falciparum* a été marquée par les anticorps (humains ou de souris) spécifiques de DG747 et de DG772, mais les stades érythrocytaires ont été marqués d'une façon différente pour les deux groupes d'anticorps. Les anticorps anti-HIS<sub>8</sub>-747 (anti-747) marquent peu les stades jeunes, mais fortement les stades schizontes mûrs, avec un marquage

localisé autour des structures knob (figure 3.2 image A), tandis que les anticorps anti-His<sub>6</sub>-772 (anti-772) marquent le parasite d'une façon plus homogène tout au long du stade érythrocytaire. Dans les espèces murines *P. yoelii* et *P. berghei*, la surface des sporozoïtes a été fortement marquée par les anticorps spécifiques des deux antigènes.

Afin de définir les tailles des protéines détectées, nous avons aussi effectué un Western Blot des extraits protéiques de parasites sanguins de *P. falciparum* avec les mêmes anticorps (figure 3.3 a et b). Les anticorps anti-747 marquent un polypeptide d'environ 70 kDa aussi bien dans les extraits d'anneaux que ceux de schizontes, tandis qu'aucune bande n'a été détectée dans les érythrocytes non parasités. Le polypeptide détecté par des anticorps anti-772 est plus grand, d'une masse moléculaire de 150 kDa, et est détecté aussi bien dans les anneaux que dans les schizontes. Le marquage d'extraits protéiques de *P. yoelii* a détecté un polypeptide de 70 kDa pour les anti-747 dans les sporozoïtes et les stades sanguins et un polypeptide de 60 kDa pour les anti-772, seulement détecté dans les sporozoïtes de *P. yoelii*.

De plus, afin de confirmer la présence des protéines et leur constance d'expression à la surface des sporozoïtes provenant de plusieurs parasites différents, nous avons examiné par IFI des lots de sporozoïtes provenant de différents isolats Thai de *P. falciparum*. Le sérum anti-772 a marqué tous les sporozoïtes, tandis que seulement 7 sur 10 des isolats testés étaient marqués par les anti-747. De même, des amplifications par PCR avec des amorces spécifiques pour les deux fragments de gène (Indiquées dans les figures 3.1a et 3.1b) ont été effectuées avec de l'ADN issu de stades sanguins de 12 souches différentes de *P. falciparum* (figure 3.4). Les produits PCR correspondant au DG772 ont été amplifiés à partir des 12 échantillons et leur taille était similaire, tandis que les amorces spécifiques pour DG747 n'ont pu amplifier un fragment qu'à partir de 9 des 12 ADN. Il faut préciser que toutes les lignées de parasites utilisées dans ce travail (T9-86, NF54 et 3D7) contiennent les gènes correspondants. Ces résultats indiquent une variation au niveau de l'expression ou de la présence de DG747 dans des souches parasitaires, car au total, seulement 15 sur 22 parasites ont semblé contenir le gène du DG747 ou ont

montré une réactivité positive en IFI. Une des amorces utilisées pour la détection du gène codant pour DG747 est situé dans la partie 3' des répétitions contenues dans le DG747, tandis que l'autre est située plus en aval ce qui pourrait expliquer l'absence d'amplification par PCR, s'il existait une variation au niveau du nombre de ces répétitions. Toutefois, les résultats restent à confirmer, de préférence sur de l'ADN issu de parasites isolés sur le terrain, car tous les parasites testés en PCR ont été cultivés à plus ou moins long terme *in vitro*, ce qui peut entraîner des délétions au niveau chromosomal. Le phénomène de délétion a d'ailleurs aussi été observé dans des populations de parasites *in vivo* (Corcoran and Kemp, 1988).

### 3.3. Reconnaissance par le système immunitaire humain dans des zones endémiques

En plus de l'étude de la constance d'expression de l'antigène, nous avons étudié la prévalence des réponses humorales d'individus vivant dans des zones de forte (Dielmo) ou de faible (Ndiop) endémie, et dans deux groupes d'âge différents dans ces deux zones (figures 3.5a et 3.5b)

On observe une même prévalence (40 %) contre 747 dans la zone de faible endémie, sauf que le nombre d'individus qui répondent fortement (l'intensité de réponse par rapport aux témoins) augmente avec l'âge. Dans la zone de forte endémie, le nombre de répondeurs contre 747 augmentent avec l'âge, ainsi que l'intensité de la réponse, et la prévalence chez les adultes, que l'on peut considérer comme ayant acquis une immunité, est de 85 %. De plus, ces réponses semblent corrélées avec l'exposition au sporozoïte, car le taux d'anticorps est plus élevé chez les individus d'un groupe d'âge donné dans une zone de transmission plus forte. Toutefois, dans une même zone, la réponse n'a pas changé d'une façon significative durant des saisons de plus faible transmission (saison sèche) (résultats non montrés), ce qui pourrait correspondre à la réponse contre les stades sanguins et/ou indiquer que la réponse immune anti-747 est de longue durée. La réponse induite par DG747 augmente en prévalence et en intensité en fonction de l'exposition et de la durée d'exposition au parasite (âge).

La réponse anti-772 augmente comme l'anti-747 en fonction de l'âge, mais avec une augmentation beaucoup moins importante, par rapport au taux de transmission observé entre Ndiop et Dielmo et par rapport à l'âge. Le taux de réponses anti-772 mesuré en % de prévalence et en intensité est plus élevé pour les individus de bas âge que celui des réponses anti-747, mais moins forte (75 %) que l'anti-747 (85 %) à Dielmo dans les individus immuns.

### 3.4. Comparaison des réponses induites par des stades différents du parasite

Nous avons le privilège d'être en possession de cellules issues d'individus immunisés avec des sporozoïtes irradiés, et de sérums provenant de personnes exposées de façon différente à l'infection parasitaire.

#### 3.4.1. Réponses cellulaires

Toutes ces études ont été effectuées en étroite collaboration avec Jean-Pierre Sauzet dans le laboratoire. Compte tenu du peu de matériel dont nous disposions, nous avons restreint les analyses afin de détecter ce que nous avons précédemment défini comme un des critères importants (rôle dans la protection) pour l'évaluation d'un potentiel vaccinal au stade pré-érythrocytaire. Nous avons étudié la sécrétion de IFN- $\gamma$  de cellules issues de 2 individus immunisés avec des sporozoïtes irradiés de *P. falciparum*, car nous avons observé, lors de l'analyse d'autres antigènes, et en particulier de LSA3, un candidat vaccin étudié dans notre laboratoire (Daubersies et al., 2000), que le taux de sécrétion de cette cytokine semble être corrélé à la protection. Chez ces deux volontaires, le nombre de cellules sécrétant l'IFN- $\gamma$  contre DG747 et DG772 est aussi élevé que pour les recombinants issus de LSA3 (729 et PC), (figure 3.6a). De plus, nous avons examiné si les réponses immunes cellulaires mesurées par la prolifération de lymphocytes T et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  différaient entre deux chimpanzés immunisés avec les sporozoïtes irradiés de *P. falciparum*, mais dont un n'était pas protégé, (figure 3.6b et figure 4.3).

Les cellules du système immunitaire de l'animal immunisé avec les sporozoïtes irradiés viables (18 kRad) et ultérieurement protégé, ont reconnu les

antigènes DG747 et DG772, ainsi que l'ont fait les cellules de l'animal immunisé avec des sporozoïtes irradiés non-viables (30 kRad), et pas protégé lors d'une infection d'épreuve.

Les proliférations lymphocytaires sont à la limite de la valeur seuil, tandis que les taux de sécrétion d'IFN- $\gamma$  sont élevés, aussi bien pour la quantité de cytokine détectée que pour le nombre de cellules sécrétrices (détecté par Elispot). Ceci est valable aussi bien pour les animaux efficacement immunisés et ceux n'étant pas protégés. Cependant, il semble que les taux de réponses sont plus élevés pour les animaux immunisés avec les sporozoïtes irradiés de 30 kRad. Les réponses induites par 747 sont plus fortes que celles qu'induit 772, et les deux plus fortes que celles induites par LSA3.

Les cellules prélevées sur des animaux ayant subi une immunisation supplémentaire par les sporozoïtes irradiés ont été endommagées lors du transport à partir du centre de primatologie en Afrique, et nous n'avons donc pas pu étudier la présence d'un « boost » induit contre ces antigènes.

#### 3.4.2. Etude des réponses humorales

Nous n'étions pas en possession des cellules de tous les groupes humains exposés de façon différente à l'infection parasitaire, mais nous avons pu étudier en détail la réponse humorale (isotypes d'IgG) de volontaires immunisés avec des sporozoïtes irradiés (ISS, seulement exposés aux stades pré-érythrocytaires), d'individus naturellement immuns vivant en zone de forte endémie (exposés à tous les stades du parasite), et d'un individu ayant été accidentellement infecté par le paludisme par transfusion sanguine, (uniquement exposé aux stades sanguins) (figure 3.7a et 3.7b).

Pour les deux antigènes, la différence la plus grande est observée pour l'isotype cytophile IgG1 dont le taux est beaucoup plus élevé dans le sérum d'individus immuns (SHI) que dans le sérum issu du malade infecté par transfusion ou de volontaires ISS. Les réponses de ces deux derniers groupes sont assez semblables et ne font pas apparaître de déséquilibre entre anticorps cytophiles (IgG1 et IgG3) et non cytophiles (IgG2 et IgG4). Nous avons en outre

remarqué que le sérum issu d'un individu exposé longuement au parasite, mais sous prophylaxie permanente (le PM), a le même profil en isotypes que les ISS.

### 3.8. Immunogénicité chez la souris

- 5 Des souris de deux souches différentes ont été immunisées avec les recombinants sous formes de protéines, avec des adjuvants différents ou sous forme de constructions d'ADN « nu », sans adjuvant.

- 10 Une étude préliminaire avec une construction ADN nu ne comportant pas de séquence signal permettant l'exportation de la protéine synthétisée a été effectuée. Les souris immunisées n'ont généré aucune réponse humorale, que cela soit pour ces deux antigènes ou pour d'autres étudiés simultanément. Cependant, nous avons détecté des réponses cellulaires spécifiques anti-747 et anti-772. Aussi bien les proliférations de lymphocytes T que le taux de sécrétion d'IFN- $\gamma$  ont été testés pour deux souches de souris, la C3H et la BALB/c. Les
- 15 profils de réponses sont présentés dans les tableaux 3.1a et 3.1b où l'on peut remarquer que pour le cas des réponses cellulaires de souris immunisées avec pNAK747, il y a aussi bien des stimulations de prolifération que de sécrétion d'IFN- $\gamma$ , tandis que pour pNAK772, les proliférations des cellules T ont été très peu stimulées par rapport à la stimulation de sécrétion d'IFN- $\gamma$  qui est
- 20 considérable. Parmi toutes les souris immunisées, le niveau le plus élevé de sécrétions d'IFN- $\gamma$  est observé lorsque le niveau de stimulation de prolifération est le plus bas.

- Les vaccinations par les autres formulations (protéine recombinante et ADN nu avec une séquence signal) ont toutes induit une réponse humorale chez
- 25 les souris (figure 3.8). Tous les sérums issus de ces souris immunisées reconnaissent la protéine native en tests d'IFI et le marquage correspond avec celui observé pour les anticorps humains immunopurifiés.

- Les réponses anti-747 présentent un profil similaire pour toutes les souris immunisées et toutes les formulations utilisées, avec une réponse isotypique à
- 30 prépondérance IgG2b. Les réponses anti-772 sont aussi similaires entre souris et formulations de vaccins, mais avec une nette prédominance des IgG1. Le profil isotypique dépend donc de l'immunogène plus que du mode de présentation



utilisé. Cependant, les titres à point final sont beaucoup plus élevés lorsque l'on immunise avec des protéines recombinantes (1/200.000) par rapport à l'ADN (1/2000), et les titres des sérums de souris immunisées avec Hls<sub>g</sub>-772 sont plus élevés que ceux des Hls<sub>g</sub>-747.

- 5        Puisque nous avons observé une réactivité croisée avec le stade sporozoïte de *P. yoelii*, nous avons testé le potentiel protecteur de ces antigènes par l'infection avec des sporozoïtes de cette espèce de souris immunisées avec les protéines recombinantes. La parasitémie a été suivie par l'observation des formes sanguines sur des frottis à partir du jour 3 de l'infection et pendant 12
- 10        jours consécutifs. Nous n'avons observé aucune protection quelle que soit la souche de souris utilisée, car la parasitémie a été détectée au même jour que celle des souris non immunisées, et la courbe était semblable à celle des souris témoins (résultats non-montrés).

15        **3.6 Données supplémentaires**

**3.6.1 DG772**

- Par RT-PCR sur l'ARN total issu de sporozoïtes et de parasites sanguins, les inventeurs ont pu déterminer les sites d'épissage de l'ARN messager correspondant au gène codant. La séquence des amorces a été extraite des
- 20        données du génome de *Plasmodium falciparum*.

          Les produits d'amplification sont de tailles identiques dans les stades sporozoïtes et les stades sanguins, et différent de la taille du produit obtenu par amplification de l'ADN génomique et par séquençage les sites d'épissages se sont avérés d'être identiques (voir les introns indiqués dans la figure).

- 25        Le gène codant pour DG772 appartient à une famille de protéines identifiés par un motif partagé. Toutes les protéines de la famille des EBP (Erythrocyte Binding Proteins) partagent des motifs conservés de résidus cystéine dont l'agencement est similaire pour toutes les protéines. Cependant, le degré d'identité ne dépasse pas 31 % (max. 57 % d'homologie), même dans les
- 30        régions les plus conservées.

### 3.6.2 Tests d'immunogénicité envisagés dans les humains.

D'après nos résultats obtenus dans les souris, nous pouvons confirmer que les antigènes DG747 et DG772 employés aussi bien sous forme d'ADN que sous forme de protéine recombinante sont immunogènes. De plus, du fait que les protéines recombinantes sont reconnues par des individus immunisés et protégés contre l'infection par des sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* indiquerait un rôle de ces antigènes dans l'immunité pré-érythrocytaire. Un test dans des primates, et en particulier des chimpanzés va nous permettre des résultats préliminaux qui nous permettront de choisir la formulation optimale pour des tests cliniques chez l'humain.

Dans les essais de phase I, afin d'étudier l'immunogénicité et la sûreté du produit, nous envisageons trois formulations toutes préparées dans des conditions GMP: 1) l'antigène sous forme de protéine recombinante purifiée à partir de la bactérie *Lactococcus lactis* (utilisation permise dans les humains) adjuvée avec l'adjuvant SBAS2 (GSK) ; 2) la construction d'ADN dans le vecteur Vical (Avantis Pasteur) ; et 3) des lipopeptides synthétiques injectés sans aucun adjuvant (v. LSA3) . Ces formulations vont être distribuées par injection sous-cutanée (au niveau du deltoïde). Par des tests préliminaux, nous savons que les antigènes His<sub>6</sub>-747 et His<sub>6</sub>-772 induisent des réponses cellulaires et des réponses humorales chez des individus n'ayant été exposés uniquement aux stades pré-érythrocytaires. Nous allons ensuite étudier les réponses cellulaires et les réponses humorales des individus immunisés par les formulations choisies en les comparant avec celles observées dans des individus immunisés avec des sporozoïtes atténués par irradiation et protégés contre une infection d'épreuve avec des sporozoïtes non-atténués. En fonction de ces réponses, une infection d'épreuve avec des sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* sera envisagée.

### 3.6.3 Homologie avec d'autres séquences nucléotidiques.

Une hybridation par Southern blot dans les conditions stringentes standard (0.1 X SSC, 60 °C) ne donnerait lieu à aucune autre hybridation qu'avec le gène correspondant.

### 3.6.4 Recherche d'homologie par des moyens bioinformatique

Les recherches ont été effectuées avec le logiciel BLAST (tblastx et blastn) sur toutes les bases de données disponibles du génome de *Plasmodium falciparum* ainsi que les bases de données d'autres organismes. Les paramètres  
5 utilisées sont les paramètres de défaut trouvées sur les site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

### **3.7 Discussion**

Ce travail qui fait partie de l'étude des antigènes exprimés aux stades pré-  
10 érythrocytaires nous a permis une première caractérisation et l'évaluation du potentiel vaccinal de deux nouveaux antigènes de *P. falciparum*. Ces deux antigènes ont des caractéristiques différentes au niveau moléculaire. D'une part, la protéine dont fait partie le DG747 contient des répétitions, tandis que la molécule contenant le DG772 n'a aucune répétition directe. Le gène Pfb0155c  
15 codant pour DG747 est petit (1524 bp) et contient une région répétitive à laquelle appartient DG747. Nous n'avons pas pu détecter la présence du gène par PCR dans toutes les souches, ni pu observer une réactivité avec toutes les souches de sporozoïtes étudiées. L'absence observée peut être due à une réelle délétion du gène ou aux procédures expérimentales. En effet, une des amorces utilisées  
20 pour la détection de la partie codante pour DG747 chevauche la partie répétitive, ce qui peut entraîner une difficulté à amplifier un gène contenant une répétition plus grande, ou à détecter un gène contenant moins de répétitions. De plus, ceci est aussi le cas pour la détection en immunofluorescence indirecte où un nombre éventuel de variations de répétitions peut changer l'affinité des anticorps  
25 spécifiques, si l'épitope cible chevauche cette région. L'expression détectée par IFI semble être présente tout au long du cycle parasitaire asexué dans l'hôte vertébré (nous n'avons pas analysé les stades sexuels). Malgré la présence de répétitions dans le DG747, nous n'avons pas détecté de réactivité croisée avec d'autres antigènes de *P. falciparum*. La séquence du gène entier n'a pas  
30 d'homologie avec d'autres protéines plasmodiales jusqu'ici identifiées, et nous n'avons pas encore d'indications sur une fonction biologique éventuelle.

## 37

Le DG772 ne contient pas de répétitions et sa présence semble être constante, qu'elle soit détectée par PCR ou par IFI. Au niveau biologique, le gène codant pour DG772 s'avère être intéressant. Nous avons trouvé par homologie de séquence que ce gène de 5300 bp de cadre de lecture ouverte fait partie de la famille des EBP (Erythrocyte Binding Protein) (Adams et al., 1992), mais que la séquence de DG772 n'appartient pas aux régions conservées de cette famille, il ne partage qu'une petite partie de séquences avec l'extrémité N-terminale de la région 3'cys. D'ailleurs, il n'a pas de réactivités croisées ni d'homologie de séquence avec DG249, un autre clone faisant partie d'une des parties consensus du gène codant pour EBA-175. Il se peut que DG772 fasse partie d'une région qui confère une particularité à chaque molécule de cette famille. La présence de deux molécules de la famille d'EBP (EBA-175 et 772) sur les sporozoïtes pourrait impliquer qu'il existe plusieurs molécules de cette famille qui interviendraient de façon alternative dans le processus d'invasion comme décrit dans les stades sanguins.

Une connaissance de la prévalence est utile lors de l'évaluation d'un candidat vaccin, et les prévalences obtenues pour DG747 et DG772, de 85% et 75 %, sont importantes. Cette étude a montré l'antigénicité importante d'une petite partie des deux molécules, et a suggéré qu'il y aurait un intérêt à étudier plus en détail d'autres epitopes de la même molécule. La réponse humorale détectée contre DG747 et DG772 dans des individus exposés en permanence indique qu'il y a une prépondérance en réponse IgG1 (type cytophile) développée lors d'une exposition soutenue qui n'est pas retrouvée dans le cas de paludisme transfusionnel. Par contre, les profils de réponses humorales obtenus pour deux groupes exposés aux stades pré-érythrocytaires à plus ou moins longue durée (PM et ISS) se ressemblent, et le niveau d'IgG1 est bas, ce qui indique que cet isotype traduit l'exposition répétée de l'antigène aux stades sanguins. L'étude des réponses cellulaires dans ces mêmes zones devra être effectuée afin d'avoir une notion plus précise des réponses immunitaires induites par ces antigènes.

Aux stades pré-érythrocytaires, nous avons observé une induction de réponse cellulaire par ces antigènes aussi bien dans des chimpanzés que chez des humains. Nous avons observé la sécrétion IFN- $\gamma$ , décrit comme un facteur

intervenant dans la protection contre les stades pré-érythrocytaires. La différence de réponse observée chez les chimpanzés en fonction de la dose d'irradiation pourrait signifier que les antigènes sont reconnus aussi bien sur les sporozoïtes que dans les stades hépatiques. En effet, les sporozoïtes irradiés à 30 kRad sont

5 incapables de pénétrer dans l'hépatocyte, et les réponses détectées sont donc seulement dues à cette exposition, tandis que les sporozoïtes irradiés à 18 kRad se développent dans l'hépatocyte, et les réponses détectées sont donc dues à ce stade. Il serait intéressant d'étudier de plus près les réponses induites dans ces deux animaux (restriction MHC1), et l'induction de « boost » de réponse lors de

10 plusieurs immunisations successives. Ce travail a aussi montré que dans ces deux fragments d'antigènes, il existe aussi bien des épitopes T que des épitopes B.

L'immunogénicité induite par les deux antigènes dans la souris est différente avec une prédominance d'IgG1 pour le DG772, qui n'est pas observée

15 pour DG747. Par contre, nous n'avons observé aucune différence dans les réponses en fonction des formulations, ce qui est intéressant car la présentation des molécules n'est pas identique pour chaque formulation. Les réponses cellulaires uniquement obtenues pour la formulation n'ayant pas induit de réponses humorales détectables montre qu'il y a eu aussi bien des proliférations

20 de lymphocytes, que des sécrétions d'IFN- $\gamma$  en fonction des souris. Les sécrétions d'IFN- $\gamma$  ont tendance à être plus élevées lorsque les taux de prolifération sont bas, mais ceci reste à être étudié plus précisément avec un nombre plus élevé de souris. L'absence de protection des souris immunisées ne permet pas d'exclure une protection chez l'homme ou par infection avec *P.*

25 *falciparum* car les épitopes cibles ne sont pas nécessairement les mêmes. Afin d'étudier un rôle dans l'interaction *P. falciparum*/hôte vertébré, nous avons à disposition un modèle *in vitro* avec des hépatocytes humains et des sporozoïtes de *P. falciparum* qui permettront l'étude de l'inhibition de l'invasion, et les études

30 *in vivo* seront possibles dans un modèle de singes *Aotus/P. falciparum* qui se trouve en Colombie. Actuellement, nous sommes en train d'effectuer le travail nécessaire pour compléter les analyses entamées sur ces antigènes pour ce qui est de l'immunogénicité.

#### **4.0: Example 2**

**Caractérisation des autres clones sélectionnés pour une étude approfondie : DG438, DG 680, et DG 1095**

5 En plus des études décrites en détail sur les 4 antigènes à l'Exemple 1, la Demanderesse a aussi étudié d'autres molécules de notre sélection d'antigènes exprimés aux stades pré-érythrocytaires: DG438, DG680 et DG1095. Les résultats préliminaires obtenus à l'Unité de Parasitologie Biomédicale ont été confirmés et quelques nouvelles données intéressantes ont été amenées.

10

#### **4.1. DG438**

Le clone DG438 a été sélectionné non seulement parce que des anticorps spécifiques reconnaissent aussi bien les sporozoïtes que les stades hépatiques et que l'antigène semble y être présent en grande quantité, d'autre part parce 15 qu'aucune réactivité croisée n'a été observée ni avec d'autres protéines recombinantes de la sous-sélection de 120 clones, ni avec les espèces plasmodiales *P. yoelli* et *P. berghei*. Ce clone correspond aux acides aminés 165-226 de GLURP (Glutamate Rich Protein) faisant partie de la région non répétée R0, qui contient les épitopes B majeurs de la molécule (Theisen et al., 20 2000). A travers une collaboration étroite avec M. Theisen à Statens Seruminstitut à Copenhague, et avec Karima Brahimi dans l'Unité de Parasitologie Biomédicale, nous avons effectué une caractérisation de l'expression de GLURP dans les stades pré-érythrocytaires et étudié l'immunogénicité de la molécule sous une nouvelle forme.

25

##### **4.1.1. Description de l'antigène**

Le gène codant pour GLURP est localisé sur le chromosome 10 (Triglia et al., 1992). Schématiquement, la protéine peut être répartie en trois parties, deux contenant des régions répétitives R1 et R2, et une ne contenant pas de répétitions, R0 (figure 4.1).

30

Les répétitions de R1 sont peu conservées et les réponses humorales d'humains exposés à la maladie sont de faible prévalence (9,8 %), tandis que les

## 40

répétitions conservées de R2 sont reconnues par 94 % et R0 par 75 % des sérums (Theisen et al., 1995).

R2 paraît être la région immunodominante de la molécule, car chez les souris immunisées induites par immunisation avec une protéine recombinante  
5 représentant la quasi-totalité de GLURP, les réponses sont dirigées préférentiellement contre R2. Tandis qu'il faut répéter les immunisations pour obtenir des anticorps dirigés contre R0 (Theisen et al., 1995).

#### 4.1.2. Confirmation de l'expression de GLURP aux stades pré-érythrocytaires

10 Une réactivité au niveau des sporozoites et des schizontes hépatiques avait déjà été détectée par IFI (Borre et al., 1991) avec des anticorps dirigés contre la R2, qui présente des réactivités croisées avec d'autres antigènes possédant les mêmes types de répétitions riches en glutamate, (Høgh et al., 1993), comme la Pf11.1 (Scherf et al., 1988), RESA, (Anders, 1986). Karima  
15 Brahimi a réalisé des études similaires avec des anticorps dirigés contre la R0, qui eux ne présentent pas de réactivités croisées avec ces molécules et a trouvé un marquage aussi bien à la surface des sporozoites de *P. falciparum* que dans le cytoplasme du schizonte hépatique très mûr (observations non montrées). Le même motif de marquage est observé avec des anticorps immunopurifiés sur la  
20 protéine de fusion  $\beta$ -gal-438.

#### 4.1.3. Etude de l'immunogénicité de DG438 sous forme d'ADN

Le sous-clonage de DG438 dans le vecteur His<sub>6</sub>-tag a été tenté, mais n'a pu être effectué. Toutes les constructions résultantes contenaient l'insert en sens  
25 inverse par rapport au promoteur, et un clonage unidirectionnel avec des sites de restrictions spécifiques pour chaque côté n'a donné aucun recombinant. Ceci est probablement dû à une toxicité de la protéine recombinante pour l'*Escherichia coli*.

Nous avons sous-cloné le DG438 dans un vecteur d'ADN nu, le pNAK, qui  
30 permet l'expression de l'antigène par la transfection de cellules eukaryotes, et nous avons immunisé des souris avec cette construction, afin d'étudier l'immunogénicité.

## 41

Le sens correct de clonage de l'insert a été confirmé par séquençage, et nous avons aussi pu détecter une expression de la protéine par transfection de cellules eucaryotes *in vitro*, suivie par une IFI avec des anticorps spécifiques anti-R0. Curieusement, l'immunisation avec cette construction, p438, n'a induit que des réponses cellulaires, tandis qu'aucune réponse humorale n'a pu être détectée, que cela soit pour le DG438 ou pour les 7 autres antigènes testés simultanément (v. chapitre 3). La réponse humorale négative ne peut pas non plus être expliquée par l'absence d'épitopes B, car il a déjà été démontré que cette région en contient plusieurs.

- 5  
10 Le tableau 4.1 résume les réponses obtenues dans des souris immunisées avec 5 injections intramusculaires de 100 µg de p438 dans du PBS par voie intramusculaire à 5 reprises (espacées de 6 semaines pour les 4 premières, et la 5<sup>ème</sup> étant effectuée 8 semaines après la 4<sup>ème</sup>).

- 15 Par opposition avec l'absence totale de réponses humorales, nous avons pu détecter des réponses cellulaires assez homogènes pour les deux souches de souris étudiées. Les souris C3H répondent soit en prolifération, soit en sécrétion d'IFN-γ, tandis que la BALB/c répondent dans les deux. On remarque une fois encore (cf chapitre 3) qu'il n'y a pas de corrélation évidente entre les deux types de réponse.

- 20 A cause de l'absence de réactivité croisée avec les plasmodies murines, nous n'avons pas effectué une infection d'épreuve par des sporozoïtes de *Plasmodium yoelii*.

#### 4.2. DG680

- 25 DG680 a aussi été sélectionné d'une part pour sa réactivité avec les stades pré-érythrocytaires, et d'autre part pour l'absence de réactivités croisées avec d'autres antigènes de la banque PM. La plaque du phage recombinant initialement sélectionné s'est avéré contenir deux fragments, l'un de 1900 paires de bases (DG680-1), et l'autre de 2200 paires de bases (DG680-2). Par  
30 séquençage, nous avons observé que les deux fragments contiennent une même séquence, l'insert le plus long contenant une partie supplémentaire en 5'. Cette différence pourrait être due à une recombinaison dans les bactériophages. Le



fragment contenu dans les clones n'a pas été entièrement séquencé, mais les 100 bp séquencés en 5'et 3' ne contiennent pas de cadre de lecture ouvert en entier. Des recherches d'homologies, par des outils de bio-Informatique dans les banques de séquences, n'ont révélé aucune homologie, mais l'ADN est riche en A et T ce qui correspond aux caractéristiques de l'ADN de *Plasmodium falciparum*. Les deux fragments ont été sous-clonés dans le vecteur d'expression pTtrc-His, mais seulement le recombinant correspondant à l'insert le plus long (His<sub>6</sub>-680) a été purifié. Nous avons utilisé la disponibilité de l'antigène pour confirmer les observations préliminaires de l'expression au stade pré-érythrocytaire, et pour effectuer des études d'antigénicité.

#### 4.2.1. Stades d'expression de l'antigène

Afin de confirmer les observations préliminaires, nous avons immunopurifié sur plaques ELISA des anticorps humains spécifiquement dirigés contre His<sub>6</sub>-680, et nous avons immunisé des souris avec le His<sub>6</sub>-680. Les anticorps spécifiques humains et murins ont été utilisés dans des IFIs et des Western Blots sur des stades différents du parasite. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 4.2 et dans la figure 4.2 (seulement pour les sporozoïtes et les stade sanguins).

Les réactivités observées en IFI sont similaires pour les anticorps humains et les anticorps de souris, et correspondent à celles observées pour les anticorps humains immunopurifiés contre le recombinant fusionné à la  $\beta$ -galactosidase préalablement établies par Karima Brahim. Au stade hépatique, on observe un marquage diffus qui est souvent observé lorsque les antigènes sont partagés entre le stade hépatique et le stade sanguin. Le marquage augmente lors de la maturation de la forme sanguine, et seule 75 % des parasites est marquée. Ceci qui peut exprimer une variation de l'expression de l'antigène. Les marquages sont localisés au niveau du cytoplasme au stade hépatique et au stade sanguin jeune. Dans les formes sanguines mures le marquage est à la surface du globule rouge ce qui pourrait traduire une exportation de la protéine.

#### 4.2.2. Antigénicité de DG680

Sur 11 sérums hyperimmuns testés en ELISA sur HIs<sub>4</sub>-680, 10 ont une réponse positive (au-dessus de la valeur seuil définie par les réponses de sérums provenant de personnes n'ayant jamais été exposées au paludisme).

- 5 De plus, nous avons testé la reconnaissance de l'antigène en ELISA par des sérums de personnes ayant été exposées uniquement aux stades pré-érythrocytaires, semblables à ceux utilisés pour notre sélection (la « PM »), ainsi que des sérums d'individus ayant été immunisés avec des sporozoites irradiés. La prévalence de réponses humorales est élevée, car 4 sérums sur 5 de
- 10 personnes naturellement exposés au paludisme mais sous prophylaxie efficace reconnaissent l'antigène, 3 sur 4 des individus immunisés par des sporozoites irradiés et protégés contre une infection par des sporozoites infectieux reconnaissent l'antigène. Cette réponse augmente d'ailleurs en fonction du nombre d'immunisations.
- 15 Nous avons également étudié les réponses cellulaires de chimpanzés immunisés avec des sporozoites irradiés de *P. falciparum* (figure 4.3). Cette figure récapitule les résultats présentés dans les chapitres 2 et 3, afin de pouvoir comparer les réponses induites pour tous les antigènes étudiés. L'antigène induit peu de prolifération cellulaire et de sécrétion d'IFN- $\gamma$  chez les animaux étudiés
- 20 par rapport aux autres antigènes. Compte tenu des réponses humorales détectées contre DG680 aux stades pré-érythrocytaires, on peut donc supposer qu'il s'agit d'un antigène qui induit de préférence une réponse humorale, et dont la stimulation cellulaire est mineure aux stades sporozoite et hépatique.

#### 25 4.3. DG1095

Le phage DG1095 contenait aussi deux inserts de tailles très différentes, d'une part un fragment de 1700 paires de base (1095-1), et d'autre part un fragment de 350 paires de bases (1095-2).

#### 30 4.3.1. Description de l'antigène et présence de réactivités croisées

Au départ, une réactivité croisée avec plusieurs clones de la banque PM avait été observée, et quelques uns faisant partie du groupe de clones

représentant les « familles » PfEMP3 ou GLURP. Le séquençage des deux inserts a montré une appartenance différente de ces deux fragments. Le DG1095-1 fait partie de PfEMP3 (voir chapitre 1), et DG1095-2 est un antigène contenant une séquence répétitive qui présente des homologies avec des  
5 séquences sur les chromosomes 4 et 12, mais dont les gènes entiers correspondants n'ont pas encore été trouvés dans le génome de *P. falciparum*. Le DG1095-2 comporte en grande partie des répétitions et en amont une partie, qui pourrait correspondre à un intron caractéristique au *P. falciparum*, (Figure 4.4). Ce fait pourrait expliquer l'absence de cadre de lecture ouvert sur la totalité  
10 du fragment.

Afin de confirmer l'expression aux stades pré-érythrocytaires et de vérifier les réactivités croisées déjà établies pour le phage mélangé, nous avons exprimé les deux protéines de fusion  $\beta$ -gal séparément et effectué l'immunopurification d'anticorps humains spécifiques.

15 La réactivité avec le PfEMP3 est due à la présence de DG1095-1 (voir chapitre 1), et une étude avec les anticorps immunopurifiés sur la protéine de fusion  $\beta$ -galactosidase du clone DG1095-2 a confirmé une réactivité croisée avec les antigènes issus des clones DG176, DG773 et DG774 (en cours d'analyse).

20

#### 4.3.2. Expression de stade

Par IFI, les anticorps humains immunopurifiés sur DG1095-1 donnent un marquage identique à celui observé pour les autres antigènes appartenant à la même partie (N-term) de PfEMP3 (chapitre 1).

25 Les anticorps humains immunopurifiés anti-DG1095-2 ont marqué en IFI tous les stades de *P. falciparum* ainsi que les sporozoites de *P. yoelli*. A cause de la présence de réactivités croisées observées avec d'autres clones, nous n'avons pas exploré plus avant la localisation par IFI et la réactivité en Western blot.

#### 30 4.4 Discussion

GLURP, dont le clone DG438 représente une partie, a surtout été étudié comme un candidat vaccin aux stades érythrocytaires, où la protéine semble être

## 45

concentrée au niveau du cytoplasme du schizonte sanguin, et est libérée en même temps que les mérozoïtes (Borre et al., 1991; Theisen et al., 1998). La protéine n'est pas attachée à la surface des mérozoïtes comme cela semble être le cas pour MSP-3. Les anticorps anti-GLURP induisent une inhibition de croissance de formes sanguines en présence de monocytes (ADCI). Aussi bien les anticorps anti-R0 que les anti-R2 semblent être impliqués dans ce mécanisme, mais les anti-R0 sont plus efficaces (Theisen et al., 1998), en particulier ceux dirigés contre P3, un peptide contenu dans la séquence de R0 (Theisen et al., 2000). Notre travail a confirmé la présence de GLURP aux stades sporozoïte et hépatique et l'antigénicité de la molécule à ces stades, et nous avons pu apporter des informations supplémentaires concernant l'antigénicité de GLURP dans les stades pré-érythrocytaires de *Plasmodium falciparum* car des sérums d'individus uniquement exposés à ces stades reconnaissent R0, une partie de l'antigène qui ne présente aucune réactivité croisée avec d'autres antigènes (Theisen et al., 2000).

Il est intéressant de remarquer que la partie de GLURP sélectionnée dans cette étude est la partie non-répétitive qui contient au moins 3 épitopes B importants définis par des peptides P1, P3, P4 (Theisen et al., 2000), et non pas la partie répétitive R2 qui est la partie contre laquelle la prévalence en anticorps est la plus élevée (94 % par rapport à 75%) dans des zones de forte endémie (Theisen et al., 1995). Cela pourrait indiquer que cette région de la molécule est particulièrement exposée au système immunitaire de l'hôte lors de la phase pré-érythrocytaire du cycle du parasite.

Des études d'individus vivant dans des zones holoendémiques ont montré qu'en fonction de l'âge, l'apparition de réponses anti-R0 et anti-R2 semble être similaire. Toutefois, il semble y avoir une corrélation aussi bien avec l'augmentation des réponses IgG2 que celles d'IgG3 pour R0, tandis que cette corrélation n'est vue que pour les réponses IgG3 dirigées contre R2 (Ouvray et al., 2000).

Peu de spéculations sur la fonction de GLURP ont abouti. Nous avons dernièrement effectué une recherche par des moyens bio-informatiques d'homologie de structures/de domaines avec d'autres protéines. Cette recherche

## 46

a résulté en la détection d'un trait commun entre la région R0 de GLURP, EBA-175 et le Tanabin, une protéine, qui semble être impliquée dans la génération de muscles, identifiée dans le Xénope (un crapaud exotique) (figure 4.1).

Des protéines homologues de GLURP ont été identifiées dans *P. knowlesi* et *P. reichenowi* (des parasites de primates dont le dernier est évolutivement proche de *P. falciparum*). Notre travail n'a détecté aucune réactivité croisée avec des sporozoites de plasmodies murins, malgré la présence des répétitions riches en glutamate, (Wiser et al., 1997). Il se peut cependant que des protéines homologues existent à d'autres stades de ces parasites mais elles n'ont pas été trouvées. De nouvelles données vont pouvoir être obtenues par analyse du génome de *P. yoelii* dont le séquençage a été récemment entamé.

Parmi les trois clones DG438, DG680 et DG1095, le clone DG438/GLURP serait le plus intéressant à exploiter, pour la caractérisation de l'immunité qu'il induit aux stades pré-érythrocytaires.

### 5.0 Exemple 3

#### Contribution à la caractérisation d'un candidat vaccin le DG571

En plus de l'analyse des 8 clones sélectionnés au départ, décrits dans les autres chapitres, les présents inventeurs ont analysé le clone DG571 dont la protéine recombinante est très antigénique et immunogénique.

Au sein de notre laboratoire, le DG571 est actuellement considéré comme le deuxième candidat vaccin des stades pré-érythrocytaires, LSA-3 étant la molécule principale (Daubersies et al., 2000).

Initialement, DG571, comportant un insert de 399 pb a été écarté en raison de la forte homologie (87%) avec la séquence de l'antigène Pf11.1 (Scherf et al., 1988), une protéine présente dans le gamétocyte et jouant un rôle dans la rupture de l'érythrocyte infecté et l'émergence du gamète. La séquence de DG571 est constituée de 15 répétitions de 9 acides aminés riches en glutamate, isoleucine et valine, et par cela a beaucoup d'homologies avec d'autres molécules de *P. falciparum* telles que le GLURP (dans la région R2) (Borre et al., 1991), le LSA3 (dans la partie répétitive) (Daubersies et al., 2000), l'antigène Pf332 (Mattel and Scherf, 1992), et le RESA (Mattel et al., 1989).

Cependant, des expériences préliminaires d'immunisation de souris et d'infections d'épreuve par *P. yoelii* effectuées par Karima Brahimi ont donné des résultats très prometteurs. Les présents inventeurs ont donc travaillé à compléter la caractérisation de cette molécule en collaboration avec Karima Brahimi, Blanca Liliana Perlaza et d'autres collègues dans le laboratoire de la Demanderesse. Dans le répertoire « PM », DG571 faisait partie d'un groupe de clones classés par réactivité croisée du double point de vue (antigénique et ADN) (tableaux 5.1 et 5.2). Les présents inventeurs ont tenté d'établir si tous ces clones faisaient partie du même gène, et si DG571 correspondait au Pf11.1, et ils ont contribué à l'évaluation de son potentiel vaccinal dans le modèle *P. yoelii*.

### 5.1. Identification des séquences des clones appartenant à la famille 571.

#### 5.1.1. Homologie de séquences

Pour chaque fragment, environ 100 pb de chaque extrémité ont été séquencées et l'homologie recherchée sur les bases de données. Les résultats sont résumés dans le tableau 5.3 et la figure 5.1. Deux des phages (322 et 263) se sont avérés contenir deux fragments différents en taille, dont seulement les 2 inserts issus du DG263 ont pu être isolés. Deux des phages (DG43 et DG88) se sont avérés être identiques en séquence, et appartenir à la partie 5' du gène codant pour Pf11.1. La séquence complète du gène de Pf11.1 n'est pas encore disponible, et de ce fait ce gène est présenté en 5 parties (part dans le tableau 5.3) comme représenté aussi dans la figure 5.1 représentant le gène et la localisation des clones qui ont une homologie des régions de ce gène.

Au total, sur les 12 clones séquencés, 7 ont des homologues significatives (> 60 % en acides aminés) avec des régions différentes du gène codant pour Pf11.1, tandis qu'un clone fait partie du GLURP et les 4 autres contiennent des nombreuses séquences répétitives du génome de *P. falciparum*. La diversité de l'origine des clones identifiés confirme les suggestions que les répétitions glu-glu riches font partie d'un épitope cross-réactif. (Anders, 1986; Mattel et al., 1989; Scherf et al., 1992b). Ces résultats soulignent les risques d'analyses où l'unique critère utilisé est la réactivité croisée immunologique.

### 5.1.2. Appartenance de DG571 au Pf11.1

A la lumière des résultats obtenus ci-dessus, nous avons voulu établir expérimentalement l'appartenance de DG571 au Pf11.1. Nous avons utilisé l'ADN des souches T9.96, 3D7 et C9 qui contiennent le gène codant pour Pf11.1, et du clone C9H12 où le gène est naturellement partiellement délété du gène (Scherf et al., 1992a) et nous avons effectué des PCRs avec des amorces spécifiques pour DG571 avec ces ADN.

Ainsi, nous avons pu confirmer qu'aucun produit amplifié ne soit détecté dans le clone C9H12, tandis que l'amplification avec l'ADN des autres souches (aussi la C9) donne un produit de la taille attendue. Ces résultats concordent avec ceux observés pour la présence du gène codant pour Pf11.1 dans ces souches.

### 5.2. Expression de stade de DG571/Pf11.1

Par IFI, les présents inventeurs ont étudié la présence de l'antigène dans les stades sporozoïtes et sanguins asexués de *P. falciparum* ainsi que sur des sporozoïtes de *P. yoelli*, à l'aide de sérums issus d'animaux immunisés avec le recombinant His<sub>6</sub>-571 ou avec la construction V1571, et des anticorps humains immunopurifiés sur le recombinant issus de sérums d'individus hyperimmuns (tableau 5.4).

Les résultats obtenus en IFI avec des anticorps humains spécifiques du His<sub>6</sub>-571 ou avec des sérums de souris sont identiques à ceux observés avec des anticorps humains immunopurifiés sur la protéine de fusion  $\beta$ -gal-571. Cependant, nous avons observé un marquage des stades sanguins, qui est fort probablement dû à la réactivité croisée avec les autres protéines glu-glu riches telles que GLURP, car il a été démontré que le Pf11.1 est absent dans ces stades (Scherf et al., 1992a). Ce marquage a aussi été observé avec des anticorps humains spécifiques du  $\beta$ -gal DG43 qui fait partie de l'extrémité N-terminale de Pf11.1. Cette expérience seule n'a pas pu conclure à la présence ou à l'absence de DG571 aux stades sporozoïtes. Cependant, un marquage identique aux stades sporozoïtes, hépatiques et gamétocytes, mais pas aux

stades érythrocytaires asexués a aussi été détecté par des anticorps spécifiques du peptide p9B (voir ci-dessous).

- La détection d'un produit de transcription par RT-PCR pourrait nous confirmer la présence de DG571 dans le sporozoïte. Cependant, cette
- 5 expérience n'a pas été possible à cause d'une contamination en ADN dans les préparations d'ARN de sporozoïtes.

### 5.3. Caractéristiques Immunologiques

#### 5.3.1. Antigénicité

- 10 Afin de comparer les protéines recombinantes à notre disposition, d'une part le His<sub>6</sub>-571 et d'autre part le pGEX-571 ainsi que deux peptides, le
- convertope contenant des répétitions « dégénérées » de répétitions trouvées dans la séquence de DG571, et le peptide P9B (PEELVEEVI) issu de séquences
- 15 répétitives de Pf11.1, les présents inventeurs ont testé la réactivité de 2 sérums provenant d'individus hyperimmuns (figure 5.2). Le niveau de réponse est le même pour tous les polypeptides utilisés mis à part une plus forte réactivité contre le pGEX571, qui est probablement due à des réponses non-spécifiques contre la partie GST.

- 20 *Réactivité des sérums de missionnaires et ISS envers 11-1 et 571.*

Les réponses humorales de personnes n'ayant été exposées qu'aux stades pré-érythrocytaires ont été étudiées d'une part avec des sérums « PM » (sujets traités à la chloroquine), et d'autre part avec ceux de personnes ayant été immunisées avec des sporozoïtes irradiés de *P. falciparum*.

- 25 Ces résultats, (figure 5.3) montre que His<sub>6</sub>-571 est reconnu aussi bien par le sérum d'individus naturellement exposés, que ceux immunisés par sporozoïtes irradiés. L'effet de « boost » ne peut expliquer ce phénomène, car la reconnaissance des sérums des individus immunisés n'augmente pas en fonction du nombre d'immunisations (non-montré).



### 5.3.2. Immunogénicité

Les résultats obtenus par Karima Brahimi dans la souris avec le pGEX571 ont montré l'importance pour l'immunogénicité de la séquence intégrale de l'antigène, par rapport aux peptides. De plus, elle a eu des indications que l'immunité induite soit protectrice (observations non publiées). Afin d'évaluer d'autres moyens de présentation de la molécule, sous forme d'ADN nu, des souris (8 pour chaque formulation) ont été immunisées avec les constructions le pNAK571 et le VI571 (DG571 cloné dans le vecteur Vical VR1020). Les études de réponses cellulaires ont été entreprises avec l'aide de Jean Pierre Sauzet et Nicolas Puchot,

La réponse humorale des souris immunisées avec pNAK571 est indétectable, tandis qu'elle est présente chez les animaux immunisés avec VI571. 8 souris ont été splénectomisées et les cellules des rates isolées pour l'étude des réponses cellulaires. Malheureusement, nous avons eu un problème de réponses non-spécifiques dans l'analyse des réponses cellulaires anti-VI571. Ce phénomène était probablement dû à la présence de LPS, auxquels les cellules de souris sont très sensibles, dans le « batch » d'antigènes utilisé pour l'analyse des réponses cellulaires.

Les réponses cellulaires obtenues avec les souris immunisées avec l'ADN (pNAK571) ont été évaluées par la stimulation de prolifération de lymphocytes T et de sécrétion d'IFN- $\gamma$  (tableau 5.5). Comme ce qui a été observé pour le DG438 (chapitre 4), il n'y a pas de corrélation entre les réponses prolifératrices et les sécrétions d'IFN- $\gamma$ . Après la 5<sup>ème</sup> immunisation, les réponses immunes détectées ont été être moins fortes qu'après la 3<sup>ème</sup> et avec un bruit de fond considérable (non montrés).

### 5.3.3. Evaluation du potentiel protecteur de DG571

Suite aux immunisations avec les constructions ADN, nous avons effectué une infection d'épreuve avec des sporozoïtes de *P. yoelli* des mêmes souris qui ont été splénectomisées, et l'apparition de la parasitémie sanguine a été suivie par analyse de frottis sanguins (figure 5.4a).

Nous avons observé un délai d'apparition de parasites sanguins d'un jour dans les souris immunisées avec pNAK571, puis une évolution de la parasitémie similaire à celle observée pour les témoins infectés simultanément. L'infection des souris immunisées avec le Vi571 n'a montré aucune protection contre l'infection parasitaire (figure 5.4b), la courbe de parasitémie des animaux immunisés étant identique à celle des animaux naïfs.

La disponibilité d'un modèle primate, l'*Aotus*, réceptif à l'infection par des sporozoïtes de *P. falciparum* (Collins et al., 1996) nous a permis d'évaluer le rôle protecteur de l'antigène DG571 dans *P. falciparum*.

L'antigène immunisant a été le pGEX571, car les études des nouvelles formulations ADN n'ont pas démontré la même efficacité chez la souris. La souche Santa Lucia de *P. falciparum* a été adaptée au modèle *Aotus* par plusieurs passages successifs primates-*Anopheles* (Blanca Liliana Perlaza, thèse). Afin de nous assurer que le gène était présent dans le parasite, nous avons confirmé la présence de la séquence correspondant à DG571, par PCR.

Le travail d'immunisation et d'infection d'épreuve a déjà été décrit en détail dans la thèse de Blanca Liliana Perlaza. L'immunisation suivie par une infection avec des sporozoïtes a montré un délai d'apparition significatif (30 jours) de la parasitémie chez les singes immunisés en comparaison avec des singes soit immunisés avec la protéine GST toute seule ou n'ayant pas été immunisés.

#### 5.4 Discussion

La famille DG571 illustre les difficultés rencontrées à cause des réactivités croisées entre des protéines de *P. falciparum*. 5/12 des clones cross-réactifs séquencés de la famille DG571 n'appartiennent pas à la même molécule. Par analyse du génome, nous n'avons pas pu établir si la séquence de DG571 appartenait au gène codant pour Pf11.1, puisque le locus situé sur le chromosome 10 n'a pas été entièrement séquencé ; ce problème a aussi entravé d'autres études sur Pf11.1 (Petersen et al., 1990; Scherf et al., 1992a). L'homologie de DG571 avec des régions connues de Pf11.1 est grande (87 % d'identité au niveau nucléotidique, mais seulement 55 % au niveau protéique) ; il est fort probable qu'il appartient à ce gène. De plus, l'absence simultanée de

Pf11.1 et DG571 dans les souches parasitaires étudiées indique une appartenance commune. D'ailleurs, la différence observée dans les répétitions (tableau 5.3) entre DG571 (T9.98) et Pf11.1 (Palo Alto) pourrait être due uniquement au fait que les deux séquences sont issues de deux souches parasitaires différentes. Il serait de ce fait intéressant d'étudier de plus près la conservation et/ou de séquence de DG571 dans des souches différentes.

Au niveau protéique, la caractérisation a aussi été problématique d'une part à cause de la taille inconnue de la protéine native et d'autre part à cause de la réactivité croisée avec d'autres antigènes. Malgré la grande homologie entre DG571 et la partie connue de Pf11.1, une protection contre l'infection par *P. yoelli* n'a été observée que pour des souris immunisées avec DG571 et non par une protéine recombinante plus longue représentant la partie N-terminale de Pf11.1 (Scherf et al., 1988) comprenant, elle aussi, des répétitions de 9 acides aminés (Karima Brahimi, observations non publiées). Ceci peut être dû soit à la nature des répétitions qui ne sont pas tout à fait les mêmes dans les deux parties de la molécule, soit à la différence de longueur, qui peut être optimale pour le recombinant DG571.

Les résultats immunologiques obtenus sont très intéressants car ils démontrent le potentiel protecteur, même si la protection n'est que partielle. Il est possible cependant que la protection observée soit due à des réactivités croisées avec d'autres molécules de *P. falciparum*; par exemple, une réactivité croisée a été détectée entre le DG571 et le DG729 (inclus dans LSA3). A présent, nous ne savons pas si les réponses immunes efficaces sont dues à l'un d'eux seulement, à la réponse induite par les deux ou à d'autres réactivités croisées avec des molécules de *P. falciparum*.

#### 4) DISCUSSION GENERALE

Les exemples décrits ci-dessus s'inscrivent dans le cadre de l'étude des antigènes des stades pré-érythrocytaires de *Plasmodium falciparum* un des agents du paludisme. Historiquement, l'investigation de ces stades a été négligée. Le sporozoïte, la forme infectieuse injectée par le moustique, n'a été décrit que 18 ans (1898) après la description du parasite sanguin, et ce n'est que

50 ans plus tard (1948) que la cellule cible des sporozoïtes, l'hépatocyte, a été découverte. Au cours de son cycle, le parasite est confronté à des environnements très divers, dans lesquels il utilise des modes de reproduction, adopte des morphologies et des métabolismes, distincts. Son adaptation à ces environnements se traduit par l'expression d'un répertoire spécifique de gènes à chaque stade. Les gènes exprimés sont tantôt des constituants essentiels à la survie du parasite comme les « gènes de ménage », tantôt des antigènes qui sont les uns spécifiques de stade (Guérin-Marchand et al., 1987; Nussenzweig et al., 1972; Waters et al., 1989) les autres présents à plusieurs stades (Goswami et al., 1997; Sanchez et al., 1994). Le développement d'un vaccin ayant été et restant un objectif majeur de recherche sur le paludisme, c'est la fonction antigénique des protéines plasmodiales qui a été le critère premier pour les identifier (Anders et al., 1985). Les stades érythrocytaires étant de loin les plus accessibles, ce sont les protéines de ces stades qui ont été initialement caractérisées et qui ont fait l'objet des études les plus extensives.

Paradoxalement, bien que le sporozoïte irradié soit le seul stade qui induise des réponses protectrices stérilisantes (Clyde, 1975; McCarthy and Clyde, 1977), très peu d'antigènes des stades pré-érythrocytaires et particulièrement de stade hépatique ont été identifiés, voire recherchés. Certes, une raison simple est que ces stades sont d'un accès particulièrement difficile, mais surtout il a longtemps été considéré que seule la protéine CS, première à être identifiée à la surface du sporozoïte, était le seul antigène responsable de cette immunité (Nussenzweig and Nussenzweig, 1989). Toutefois, les nombreuses tentatives d'immunisation basées sur la protéine CS n'ont pas permis d'induire chez l'homme une protection stérilisante aussi efficace que celle induite par l'immunisation par des sporozoïtes irradiés (Nardin and Zavala, 1998). L'observation, faite dans notre laboratoire, que des sérums humains immuns déplétés en anticorps anti-CS réagissaient encore fortement avec la surface des sporozoïtes de *P. falciparum* (Galey et al., 1990) a indiqué que de nombreuses autres protéines étaient présentes et qu'elles étaient antigéniques. De plus, la démonstration que la présence de formes hépatiques bloquées dans leur développement était indispensable à l'induction d'une protection stérilisante par

les sporozoïtes irradiés (Mellouk et al., 1990; Scheller and Azad, 1995), a rendu nécessaire l'identification des antigènes exprimés à ces stades.

Par un moyen de criblage astucieux, développé dans notre laboratoire, ciblant spécifiquement des antigènes reconnus par des sérums d'individus exposés uniquement aux stades pré-érythrocytaires, un répertoire de 120 clones, la sélection PM, issu d'une banque génomique d'expression de *P. falciparum*, a été obtenu (Marchand and Drulhe, 1990). Pour partie qu'il soit, il est à noter que ce criblage avait l'avantage d'être basé sur les réponses induites chez l'hôte naturel et non sur des réponses induites dans des modèles animaux artificiels.

Alors que pendant près de 20 ans la protéine CS a été la seule molécule attribuée aux stades pré-érythrocytaires et étudiée, aujourd'hui près de 16 antigènes de stades pré-érythrocytaires sont caractérisés (Drulhe et al., 1998). Douze sont issus de la sélection PM, et 7 d'entre eux ont été identifiés au cours de cette thèse.

Les quatre premiers antigènes identifiés dans le répertoire PM ont apporté des informations qui nous ont servi dans la sélection de nouveaux antigènes à étudier. Ils présentent des caractéristiques diverses, mais tous sont exprimés au stade hépatique. LSA-1 a été le premier antigène à être identifié après la CS (Guérin-Marchand et al., 1987). Sa principale particularité consiste en son expression strictement limitée au stade hépatique. SALSA, STARP et LSA-3 ont été sélectionnés à cause de leur abondante expression à la surface du sporozoïte (Bottius et al., 1996; Fidock et al., 1994a). La présence du deuxième à la surface du sporozoïte semble jouer un rôle biologique, car des anticorps spécifiques anti-STARP inhibent l'invasion de sporozoïtes de *P. falciparum* dans des hépatocytes humains (Pasquetto et al., 1997). SALSA est le seul des 4 antigènes qui ne contient pas de région répétitive. Il présente une caractéristique controversée, car une partie de la protéine est homologue à un antigène du stade sanguin, le MSP-4 (Marshall et al., 1997). Cependant, il existe une différence de taille des protéines dans les sporozoïtes et les stades érythrocytaires, ce qui pourrait correspondre à un épissage différentiel selon le stade, ce qui reste à démontrer. Le LSA3, le dernier des 4 antigènes à être identifié, est l'unique antigène reconnu différemment par des sérums de volontaires ou de

chimpanzés protégés par l'immunisation avec des sporozoïtes irradiés. De plus, il est le seul à avoir pu induire une protection stérilisante chez plusieurs primates infectés par *P. falciparum* (Daubersies et al., 2000).

Le but de ces travaux était d'approfondir notre connaissance du répertoire des antigènes pré-érythrocytaires et de les caractériser au plan moléculaire et immunologique. Sur les 120 clones, 26 avaient été attribués aux 4 premiers antigènes. Il restait donc 94 clones qui, d'après la classification effectuée sur la base des réactivités croisées immunologiques et des hybridations croisées, représenteraient approximativement 30 gènes. Un choix s'imposait et les 8 clones étudiés au cours de cette étude ont été sélectionnés de la façon la plus rationnelle possible, toutefois sur une base d'informations extrêmement parcellaires. Par exemple certains appartiennent à des familles de clones cross-réactifs (comme pour LSA1 ou LSA3), tandis que d'autres sont représentés par un seul clone, comme la protéine CS.

Les résultats acquis au cours de ces travaux auront tout d'abord confirmé qu'il existe encore un grand nombre d'antigènes exprimés aux stades pré-érythrocytaires qui restent à identifier. En effet, 7 antigènes étaient représentés dans la sélection totale de 8 clones que analysés:

- Trois étaient déjà connus aux stades érythrocytaires. L'un d'eux représentait GLURP (DG438) (Borre et al., 1991), confirmant ainsi sa présence aux stades pré-érythrocytaires et démontrant son antigénicité à ces stades. Les deux autres (PfEMP3 et EBA-175) avaient été l'objet d'études antérieures, mais leur expression à ces stades n'avait jamais été étudiée.
- Quatre sont des gènes nouveaux (DG747, DG772, DG680 et DG1095-2) dont l'expression aux stades pré-érythrocytaires a été démontrée pour la première fois au cours de cette étude.

Ainsi, l'expression de 6 des 7 gènes au niveau du sporozoïte et/ou des stades hépatiques a ici été démontrée pour la première fois. À la différence des 4 premiers gènes, ils se sont tous avérés être aussi exprimés aussi aux stades érythrocytaires asexués. Enfin, en collaboration avec d'autres collègues du laboratoire, les présents inventeurs ont aussi contribué à la caractérisation d'un antigène hautement répétitif, DG571 (apparenté au Pf11.1) qui a un intérêt

évident puisqu'il induit une protection chez la souris contre un challenge par *P. yoelii* et chez le primate par *P. falciparum*.

Notons que les indications initiales qui attribuaient ces 8 antigènes aux stades pré-érythrocytaires ont été pleinement confirmées par les études plus  
5 détaillées que nous avons réalisées.

### Répertoire d'antigènes pré-érythrocytaires

Sur les 12 antigènes caractérisés à partir de la sélection PM, les 7  
nouveaux antigènes sont partagés entre les stades pré-érythrocytaires et  
10 érythrocytaires. Les études préliminaires (hybridation, réactivités croisées  
immunologiques, entreprises sur les 79 clones restants) suggéraient qu'un  
maximum de 30 gènes différents correspondissent aux 120 clones. Or, 3 des 7  
antigènes avaient déjà été caractérisés aux stades érythrocytaires. Avec un  
nombre estimé de 7000 gènes dans le génome de *P. falciparum*, (Chakrabarti et  
15 al., 1994) (environ 26 mégabases) les chances de retrouver l'un des quelque 50  
gènes déjà connus (principalement de stade érythrocytaire) étaient à priori  
faibles. On aurait dû s'attendre à un plus grand nombre d'antigènes nouveaux et  
pour la plupart spécifiques des stades pré-érythrocytaires.

Plusieurs facteurs pourraient expliquer pourquoi il n'en a pas été ainsi :  
20 Il se pourrait que le nombre d'antigènes présents aux stades pré-érythrocytaires  
soit restreint (moindre que celui exprimé aux stades sanguins). Toutefois, les  
parasites ont à ces stades une taille, un degré de complexité au moins égal, des  
fonctions complexes à assurer, ce qui rend cette hypothèse peu vraisemblable.  
D'ailleurs en Western blots d'extraits de sporozoïtes on détecte un grand nombre  
25 d'antigènes.

Les défenses immunitaires contre le stade hépatique seraient surtout de  
type cellulaire. La stratégie de double criblage par anticorps pourrait avoir biaisé  
la sélection. Cependant, les protéines étudiées jusqu'à présent comportent aussi  
bien des épitopes pour les cellules B que pour les cellules T, et les Western Blots  
30 mentionnés ci-dessus mettent bien en évidence des réponses humores.  
Il est possible qu'un grand nombre de protéines des stades pré-érythrocytaires  
soit peu antigéniques. Cette hypothèse est assurément contredite par les études

menées en zone d'endémie, qui montrent une prévalence élevée et des taux élevés de réponses B, Th, CTL contre les antigènes caractérisés, c'est à dire une antigénicité très élevée. Il demeure possible que certains antigènes n'induisent qu'une réponse locale.

5 Plusieurs des protéines exprimées au stade hépatique pourraient être plus difficilement accessibles au système immunitaire que celles de stade sanguin. Il est évident que le nombre de sporozoïtes, et surtout de formes hépatiques vues par le système immunitaire (10 par infection, et seulement pendant quelques jours), est insignifiant par rapport à celui des formes érythrocytaires ( $>10^{11}$  de façon chronique). Dans ces conditions les molécules de stades pré-érythrocytaires pourraient être en partie « cachées », au système immunitaire.

10 Le nombre total de gènes de *P. falciparum* prédits par moyens bio-informatiques pourrait être surestimé. Cela a été le cas pour le génome humain: environ 30.000 au lieu de 140.000 gènes. Suivant une surestimation du même ordre, le génome de *P. falciparum* pourrait ne contenir que 1500 gènes, voire moins. De plus, l'annotation du génome de *P. falciparum* demeure incertaine, car la structure de l'unité codante est encore peu connue (promoteur, introns, exons). D'ailleurs, l'existence de gènes « atypiques », qui n'avaient pas été attribués par le projet génome, a déjà été décrite par d'autres approches (Watanabe et al., 2001). Cependant, un faible nombre de gènes n'implique pas que le parasite soit moins complexe car d'autres mécanismes, comme des épissages alternatifs ou des changements de cadre de lecture augmentent vraisemblablement la diversité fonctionnelle d'un même gène (Bischoff et al., 2000).

25 Les raisons évoquées ci-dessus ne sont pas mutuellement exclusives et la limitation du nombre d'antigènes différents présents aux stades pré-érythrocytaires peut être due à une combinaison de ces divers facteurs. Quoiqu'il en soit, notre stratégie de sélection aura eu le mérite d'accroître considérablement le répertoire des antigènes connus comme exprimés aux stades pré-érythrocytaires. Notons aussi qu'un des antigènes nouveau, le DG747, n'avait pas encore été détecté par les nombreuses analyses du répertoire de gènes exprimés au stade érythrocytaire. Ceci rappelle qu'aucun



moyen de criblage n'est totalement efficace, et qu'il est utile de varier les stratégies afin d'obtenir des données complémentaires.

### La spécificité de stade peut remettre en question la fonction de certains antigènes

En dehors de leur nature antigénique, la fonction des diverses nouvelles protéines de *Plasmodium* aux stades pré-érythrocytaires demeure, comme pour la presque totalité des antigènes des autres stades, encore largement inconnue. On présume souvent que peu d'antigènes sont partagés entre les différents stades. Notre étude a clairement démontré, qu'une réévaluation de cette conception serait nécessaire, car des antigènes comme GLURP, DG571, PfEMP3 et EBA-175, tous trouvés au stade sanguin asexué sont aussi exprimés aux stades pré-érythrocytaires. La présence en surface du sporozoïte des 8 antigènes étudiés au cours de cette étude en fait au moins des cibles potentielles d'action des anticorps. Ceci a pu être démontré pour deux d'entre eux (PfEMP3 et DG571), les autres n'ayant encore pu être étudiés. Leur présence au stade hépatique et l'existence de réponses T IFN- $\gamma$  + trouvées pour quelques-uns en fait des cibles de mécanismes de défense majeurs contre ce stade. L'identification de ces protéines au niveau du sporozoïte, suggère un rôle des de ces antigènes dans l'interaction parasite/hôte à d'autres stades du cycle parasitaire chez l'hôte vertébré. Dans ce contexte, les observations les plus fascinantes concernent la démonstration que des antigènes PfEMP3 et EBA-175, qui sont connus pour leurs interactions avec la membrane du globule rouge, sont retrouvés exprimés en surface du sporozoïte. Ces observations ne laissent pas de surprendre, car il y a en principe peu de molécules communes à la surface du globule rouge et de l'hépatocyte. Il est évident qu'il faut procéder à une réévaluation de leur fonction (cyto-adhérence et invasion, respectivement).

Le PfEMP3, présent dans les structures nodulaires spécifiques du stade érythrocytaire (« knob-like protrusions »), semble néanmoins avoir aussi un rôle biologique différent dans les stades sporozoïtes, puisque des anticorps naturels dirigés contre cette molécule inhibent l'invasion de l'hépatocyte *in vitro* et *in vivo*. Le PfEMP3 pourrait ainsi avoir une fonction double. Il a été suggéré que PfEMP3

serait un transporteur de PfEMP1 (Waterkeyn et al., 2000), une protéine intervenant dans la cyto-adhérence des stades érythrocytaires (Newbold et al., 1997). Ce rôle de transporteur d'une molécule semblable à PfEMP1, ou autre, reste à étudier aux stades pré-érythrocytaires, aussi bien sur le sporozoïte que

5 dans le stade hépatique, par exemple à l'aide des parasites délétés spécifiquement du gène codant. Le fait que nous avons trouvé des réponses immunes différentes pour les parties N-term et C-term de PfEMP3 pourrait indiquer des fonctions distinctes de ces deux parties en fonction du cycle parasitaire.

10 L'antigène EBA-175 (DG249), qui n'avait été impliqué que dans l'invasion du globule rouge par le mérozoïte sanguin, se trouve aussi à la surface du sporozoïte. Sachant que des mérozoïtes peuvent envahir les globules rouges par un mécanisme alternatif où l'EBA-175 n'est pas impliqué (Okoyeh et al., 1999) et qu'aucun parasite naturellement délété du gène codant pour EBA-175 n'a pu être

15 trouvé jusqu'à présent, on pourrait spéculer que ceci est dû à un rôle essentiel d'EBA-175 au niveau de l'invasion par le sporozoïte. Il est à présent nécessaire d'étudier si l'EBA-175 intervient dans l'invasion de l'hépatocyte ou de la glande salivaire du moustique et s'il est présent sur l'ookinète, la seule autre forme invasive du parasite. Une partie de ces études est en cours. Il est important de

20 noter aussi que l'EBA-175 appartient à une famille fonctionnelle, les Erythrocyte Binding Proteins (EBPs), jusqu'à présent uniquement décrite aux stades sanguins. Ces protéines sont caractérisées par des régions homologues riches en cystéines, et leurs gènes sont structurellement homologues par la présence et la position des introns ainsi que par leur taille. Il est de ce fait notable qu'un autre

25 antigènes parmi les 8 clones étudiés, le DG772, soit également un membre, jusqu'à présent inconnu, de la famille des EBPs, et qui n'a pas d'homologies de séquences ou de réactivités croisées avec DG249.

Nous avons démontré que plusieurs membres d'une famille de protéines cross-réactives (riches en glu-glu) sont exprimés aux différents stades. Ainsi la

30 « famille » DG571 s'est avérée constituée d'antigènes différents, mais contenant tous un motif riche en glu-glu. Ces antigènes sont représentés, entre autres, par les régions répétitives de Pf11.1 et GLURP. La réactivité croisée au stade

sanguin entre plusieurs de ces antigènes a déjà été décrite pour RESA, Ag332, GLURP et Pf11.1 (Anders, 1986; Høgh et al., 1993; Scherf et al., 1988) mais peu d'analyses ont été effectuées sur leur expression aux stades pré-érythrocytaires. Notre étude a confirmé la présence de GLURP aux stades pré-érythrocytaires, car nous avons identifié plusieurs régions de cet antigène dans la sélection « PM ». Il est par ailleurs à noter que l'un des 8 clones étudiés (DG438) correspond à une région non cross-réactive de GLURP (R0) cible de mécanismes de défense contre les stades érythrocytaires, actuellement en phase clinique de développement vaccinal. De la même façon, nous avons démontré que DG571 est aussi exprimé aux stades pré-érythrocytaires. Ces observations, dans le contexte de la sélection d'antigènes par des anticorps spécifiques de stade pré-érythrocytaire, indiquent que ces deux molécules sont antigéniques lorsqu'elles sont présentées par le stade sporozoïte et/ou hépatique. Elles s'ajoutent à l'autre antigène des stades pré-érythrocytaires contenant des répétitions riches en glu-glu, LSA3.

#### Antigénicité et Immunogénicité

Dans l'objectif de la caractérisation immunologique et pour permettre une première évaluation d'un candidat vaccin potentiel, nous avons étudié l'antigénicité et l'immunogénicité aux stades pré-érythrocytaires et érythrocytaires. Pour ceci, trois caractéristiques devaient être établies 1) la reconnaissance de ces protéines aux stades pré-érythrocytaires par le système immunitaire 2) la prévalence de réponses induites 3) l'évaluation du potentiel protecteur de ces réponses.

L'identification des protéines par les anticorps de l'individu exposé aux seuls stades pré-érythrocytaires était une première indication de leur antigénicité à ces stades. De plus, l'observation que des sérums d'individus immunisés avec les sporozoïtes irradiés, qui par ailleurs reconnaissent très peu de molécules de *P. falciparum*, reconnaissent aussi ces antigènes, confirme cette antigénicité.

Des études sur LSA-3, un antigène ayant un potentiel vaccinal, ont permis de développer de nouveaux critères de sélection de candidats vaccins. Par l'étude comparative de chimpanzés ou d'individus immunisés par des sporozoïtes

irradiés à dose optimale (protecteurs) ou à dose létale (non-protecteurs) et par l'immunisation avec LSA3, il a été observé que l'induction de lymphocytes CD4+ sécrétant de l'IFN- $\gamma$  constitue un marqueur sinon le mécanisme lui-même de la protection. Il est de ce fait important de noter que nous avons détecté une

5 sécrétion d'IFN- $\gamma$  substantielle en réponse aux antigènes DG249, DG680, DG747 et DG772 chez des chimpanzés immunisés par sporozoïtes irradiés, et aux antigènes DG747 et DG772 chez des humains immunisés par la même méthode. De plus le profil de réponse différait en fonction de l'état de protection lors d'une infection d'épreuve, de façon tout à fait semblable à ce qui avait été observé pour

10 LSA3. Ces observations contrastent avec le faible nombre d'antigènes réactifs chez ces individus, ainsi 8 peptides dérivés de SALSA, STARP, LSA1 étaient négatifs. De ce fait, les résultats obtenus soulignent très fortement l'intérêt de ces deux antigènes nouveaux.

Ce même marqueur est retrouvé chez des souris immunisées avec

15 LSA3 (en raison d'une réactivité croisée avec une protéine homologue sur les sporozoïtes de *P. yoelii* PyLSA3 ; Karima Brahmil, sous presse), challengées par des sporozoïtes de *P. yoelii* et protégées (Sauzet et al., 2001).

L'existence d'une réactivité croisée entre certains de nos antigènes de *P. falciparum* et des homologues de *P. yoelii* (comme pour LSA3) ont conduit à

20 l'utilisation de ce modèle de laboratoire pour l'étude du potentiel vaccinal de ces antigènes. Des 7 nouveaux antigènes, 5 ont montré une telle réactivité croisée. Nous avons donc immunisé des souris, mais dans aucun cas, nous n'avons pu obtenir une protection stérilisante lors d'une infection par des sporozoïtes de *P. yoelii*, comme il a été observé pour LSA3. Toutefois rien ne prouve que les

25 épitopes cross-réactifs soient les mêmes que ceux qui sont les cibles de mécanismes de protection.

D'un point de vue vaccinal, le potentiel d'un antigène dépend aussi de la constance de reconnaissance dans une population immune. Pour un antigène donné, nous avons détecté des prévalences de réponses immunes variables

30 chez les individus vivant en zone d'hyper-endémie et considérés comme ayant développé une immunité indépendante de souche. La variation observée peut être due à l'absence du gène (comme cela pourrait être le cas pour DG747) ou

- de son expression (comme détecté en IFI pour DG747 et DG680) dans diverses souches du parasite. Par ailleurs, le niveau d'immunité peut varier d'un individu à l'autre et d'un moment à l'autre en fonction de l'exposition et des infections récentes. Ces observations renforcent l'importance des centres de Ndlo et
- 5 Dielmo au Sénégal, où nous avons eu accès à des individus suivis de façon étroite. Nous avons donc pu employer des critères plus précis lors de la sélection des sérums utilisés pour les analyses de la prévalence contre EBA-175, DG772 et DG747. C'est ainsi que nous avons pu montrer une augmentation importante d'une réponse anti-DG747 en fonction de l'exposition, malgré son absence
- 10 apparente dans certaines souches étudiées.

Toutefois, la conservation de DG 747 demande à être mieux étudiée dans la mesure où les PCR négatives ne constituent pas une preuve absolue, surtout quand on amplifie des zones répétitives de longueurs variables.

#### 15 Cibles de l'immunité spécifique de stade

- Le concept que l'immunité protectrice contre le paludisme est spécifique de stade découle de nombreuses observations expérimentales. Tout d'abord l'immunité induite, qu'elle soit de stade pré-érythrocytaire ou de stade érythrocytaire, ne permet pas de protection totale entre les stades (James, 1936).
- 20 La seule immunité stérilisante a été induite par des sporozoïtes irradiés. L'immunité naturelle est le résultat d'un équilibre qui s'établit entre hôte et parasite après des expositions continues et elle n'est pas stérilisante. On a longtemps cru que les cibles de ces immunités (induites ou naturelles) étaient différentes selon le stade, et que l'immunité contre les stades pré-érythrocytaires
- 25 n'intervenait pas dans l'immunité naturelle. Cependant, des observations récentes laissent penser que ces mécanismes ne sont pas exclusifs, car ces données indiquent l'existence d'une immunité naturelle anti-stade pré-érythrocytaire (Druilhe et al., 1998) qui aurait un rôle non-négligeable.

- Il est à noter que le criblage initial, effectué par la détection de réponses
- 30 immunes contre les stades pré-érythrocytaires, a jusqu'à maintenant identifié une majorité d'antigènes communs à plusieurs stades, et qu'un seul antigène, LSA1, est strictement spécifique du stade hépatique. L'immunisation avec ce dernier

antigène n'a pas permis d'induire jusqu'à présent une protection stérile contre une infection avec des sporozoïtes. Reste à évaluer l'importance des antigènes exprimés à plusieurs stades du cycle parasitaire. Sachant que les réponses immunitaires induites diffèrent en fonction du stade parasitaire, nous avons  
5 effectué une analyse comparative des réponses immunes spécifiques chez des individus exposés à divers stades du cycle du parasite (stades pré-érythrocytaires ou stades sanguins seulement, ou les 2 à la fois) contre un antigène donné. Nous avons observé que les réponses contre PfEMP3, DG249, DG747 et DG772 semblent différer en fonction du type d'exposition au parasite et  
10 que ces antigènes sont donc non seulement exprimés à plusieurs stades, mais aussi cibles de réponses immunes qualitativement différentes.

Un antigène ayant aussi des caractéristiques immunologiques différentes en fonction des stades est l'antigène GLURP. La région R0 est déjà cible de réponses humorales en zone d'endémie qui sont corrélées avec l'acquisition de  
15 l'immunité naturelle (Oeuvray et al., 2000). Ces anticorps sont de plus efficaces dans un test d'inhibition de développement du parasite sanguin (Theisen et al., 2000). Curieusement, la même région est aussi cible de réponses aux stades pré-érythrocytaires. Il se pourrait que la présence de l'antigène à la surface du sporozoïte et au stade hépatique joue un rôle dans l'immunité acquise. Ceci reste  
20 à vérifier par exemple par le test d'inhibition d'invasion de sporozoïtes, dans les hépatocytes. De plus, une autre partie de GLURP, le R1 contenant une répétition riche en glu-glu a été détectée dans notre sélection. Cette région, avec plusieurs autres antigènes, pourrait jouer un rôle dans un réseau cross-réactif entre antigènes et entre stades.

25

### **5) PERSPECTIVES**

L'accès difficile aux stades sporozoïtes et surtout hépatiques du parasite a été en partie contourné par la stratégie de criblage par des anticorps spécifiques de stade. La révolution actuelle en bio-informatique va apporter de nouveaux  
30 outils qui pourraient contribuer à achever de surmonter ces difficultés.

Avec l'instauration du Génopole à l'Institut Pasteur et la mise à disposition de VAX<sup>®</sup> très performants pour les séquences, la prospection ciblée de gènes

va pouvoir être intensifiée. Ainsi, il sera possible de répertorier les familles multigéniques (*ebp*, *var*, *stevor*, *rif*), les structures de gènes partagées et/ou spécifiques entre espèces plasmodiales, ou avec d'autres organismes. La recherche des domaines partagées avec les protéines d'autres protozoaires de la famille des apicomplexes ou avec les protéines de l'hôte (moustique ou mammifère) sera très utile dans l'analyse des interactions hôte-parasite.

D'autres moyens technologiques développés récemment contribuent à accélérer la caractérisation des protéines de *Plasmodium*. La digestion protéolytique de protéines parasitaires, analysées par la technique MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry), associée à l'utilisation des données génomiques, la mise en évidence de l'expression différentielle de stades à l'aide de puces à ADN (Mamoun et al., 2001) sont des outils nouveaux et performants.

Toutefois l'exploitation optimale des données génomiques et protéiques brutes ne peut se faire que dans un contexte de connaissances biologiques et de disponibilité d'outils fonctionnels qui sont encore très limités. Dans un premier lieu, il faudra trouver un moyen d'identifier de nouveaux gènes potentiellement exprimés aux stades pré-érythrocytaires, puis apporter une preuve irréfutable de cette expression. Il nous semble qu'un outil essentiel dans l'exploitation de la séquence du génome de *P. falciparum* sera précisément l'utilisation des informations dérivées du répertoire de gènes récemment caractérisés. Les 17 gènes à présent connus (tableau D1) donnent en effet accès aux caractéristiques spécifiques à l'expression de stade (promoteurs -parties régulatrices, localisations chromosomiques - subtelomériques, autres éléments extra-géniques - UTR, motifs communs -structuraux ou répétitions). D'autres technologies, telles que l'expression par débit élevé (high through-put) pourront contribuer à accélérer l'étude fonctionnelle des gènes sélectionnés.

Le peu de matériel parasite disponible au stade sporozoïte, et le manque de matériel au stade hépatique, demeurent néanmoins des obstacles majeurs. Aussi, est-il essentiel que parallèlement à l'exploitation de ces techniques des progrès soient aussi fait dans le maniement et la production de ces stades du cycle de *Plasmodium*, les seuls capables d'induire une immunité

stérilisante. De plus, il pourrait exister des failles dans les banques de données génomiques existantes. Par exemple, celles-ci ne sont dérivées que d'un clone parasite (3D7) longuement maintenu dans un laboratoire, alors qu'il existe un très grand polymorphisme d'une souche à l'autre, et des remaniements chromosomiques (délétions ou recombinaisons (Kemp et al., 1985)) ont certainement eu lieu.

Reste enfin l'évaluation du potentiel vaccinal. Cette évaluation est difficile car on ne connaît pas encore les mécanismes précis de l'immunité particulièrement aux stades pré-érythrocytaires. Nous avons en main plusieurs critères aidant à cette évaluation, dont la plupart restent encore valables. D'un point de vue immunologique l'induction d'immunité protectrice par immunisation dans des modèles d'animaux, les réponses chez des sujets naturellement exposés et les réponses induites par les sujets ou les primates immunisés par les sporozoïtes irradiés ont permis un criblage initial. Au niveau moléculaire, la présence du gène et la conservation d'expression dans des souches parasites différentes a aussi été un critère important. Ainsi dans le cas de LSA-3, la validité de ce critère a été confirmée par la conservation de séquence dans plus de 50 isolats. Un critère habituel d'exclusion d'un antigène est son expression à plusieurs stades, en raison de la notion d'immunité spécifique de stade, discutée plus haut. En fait, ce critère doit être réévalué. En effet, il semble que le problème soit plus complexe, comme l'indique le fait que la plupart des molécules identifiées dans cette étude sont partagées entre les stades. Les réponses induites par le même antigène à deux stades différents peuvent aussi différer (comme les parties N-term et C-term de PfEMP3), et pourrait avoir de ce fait des fonctions protectrices différentes. Deux candidats vaccins, GLURP et DG571, pourraient ainsi induire des réponses influençant le parasite à d'autres stades que ceux ciblés initialement. Par ailleurs, les antigènes DG747 et DG772 se sont avérés intéressants non seulement par leur capacité à induire des réponses immunitaires représentant des marqueurs de protection potentiels, mais aussi par la forte prévalence de réponses immunes en zone d'endémie (DG772, DG747), et par la présence constante du gène codant (DG772) dans toutes les souches étudiées. PfEMP3 a un intérêt majeur par sa capacité à induire une inhibition



d'invasion des sporozoïtes, et la présence d'EBA-175 dans toutes les souches parasitaires étudiées suggère un rôle crucial aux stades pré-érythrocytaires, comme nous l'avons discuté plus haut.

De nouveaux candidats vaccins des stades pré-érythrocytaires s'ajoutent donc au LSA3, un candidat-vaccin prometteur. Les critères de choix ne sont pas identiques pour tous, et tous nécessiteront des études plus approfondies dans les modèles de sporozoïtes irradiés, et les immunisations de primates suivies d'infection d'épreuve par *P. falciparum*. A priori, les modes d'immunisation ayant fait leurs preuves pour d'autres molécules vaccinales seront employés dans ces essais (protéines recombinantes avec l'adjuvant SBAS2 ou adsorbées sur des micro-billes, vaccination avec l'ADN nu).

L'identification de tant de nouveaux antigènes aux stades pré-érythrocytaires avec des caractéristiques variées rend légitime d'envisager un vaccin qui ciblerait plusieurs stades, soit par l'utilisation d'un cocktail d'antigènes qui chacun induirait des réponses immunes différentes, si possible complémentaires connaissant la complexité du parasite, soit en utilisant un antigène ayant des cibles de réponses immunes à plusieurs stades. L'association d'antigènes présente les avantages de combiner les propriétés complémentaires de plusieurs molécules et de réduire les risques d'échecs dus à des mécanismes d'évasion (diversité antigénique, délétions chromosomiques, mécanismes alternatifs d'évasion) Cette approche comporte cependant le risque d'induire des réponses immunitaires antagonistes, et c'est pour cela que l'étude de chaque antigène - aussi bien pour le stade d'expression que pour l'antigénicité aux différents stades du cycle parasitaire dans l'hôte vertébré - demeure impérative avant de les associer.

Le stade hépatique de *P. falciparum* reste un stade très peu connu et peu exploité; c'est paradoxal car c'est pourtant le stade ciblé par le moyen de vaccination le plus efficace identifié jusqu'ici. Dans notre travail, nous avons pu identifier 6 nouveaux antigènes exprimés aux stades sporozoïte et hépatique et initier leur caractérisation aussi bien au niveau immunologique qu'au niveau biologique.

67

Notre stratégie de sélection a permis d'augmenter sensiblement le nombre d'antigènes identifiés aux stades pré-érythrocytaires. Nos résultats ont aussi établi que les interactions hôte-parasite étudiées par la fonction des protéines parasitaires tout au long du cycle parasitaire nous réservent encore des surprises. Il est clair que la phase intra-hépatique n'a pas seulement une seule fonction multiplicatrice (celle-ci est amplement assurée au stade érythrocytaire), et c'est la seule phase contre laquelle des mécanismes de défense « absolus » stérilisants existent. La quête d'antigènes pré-érythrocytaires reste donc une priorité dans l'acquisition de la connaissance de la biologie du parasite et l'élaboration de nouveaux moyens de contrôle.

Bien que la présente invention ait été décrite par rapport aux réalisations concrètes et privilégiée, il apparaîtra toutefois évident aux personnes versées dans l'art ou la science en cause qu'il est possible d'introduire un certains nombres de variations et modifications sans déroger à la portée de l'invention décrite dans ce document.

75

Antigène	Références <sup>1</sup>	Stades d'expression <sup>2</sup>				Localisation <sup>3</sup>	Structures	
		S	H	SSA	SSS		Intron	Reps
CS	(Nardin et al., 1982)	+	j	-	-	CHR3	+	+
LSA1	(Guérin-Marchand et al., 1987)	+	j,m	-	-	CHR4	-	+
TRAP	(Robson et al., 1988)	+	j,m	m	-	CHR13	-	+
PfHsp70	(Renia et al., 1990)	+	j,m	j,m	-	CHR13	-	+
STARP	(Fidock et al., 1994)	+	j,m	-	-	CHR12	+	+
EXP-1	(Koenen et al., 1984), (Sanchez et al., 1994)	-	m	j,m	Nt	CHR12	-	+
Pfs16	(Bruce et al., 1990)	+	nt	-	+	?	-	-
SALSA	(Bottius et al., 1996)	+	j,m	-	-	CHR2	+	-
LSA3	(Daubersies et al., 2000)	+	j,m	-	-	CHR2	+	+
DG571	Brahimi (non publié)	+	j,m	-	+	CHR10	?	+
PIEMP3	(Pasloske et al., 1993), (Grüner et al., 2001)	+	j,m	j,m	-	CHR2	+	+
GLURP	(Borre et al., 1991)	+	m	j,m	Nt	CHR10	-	+
EBA-175	(Camus and Hadley, 1985)	+	j,m	j,m	-	CHR4, 13?	+	-
DG747		+	j,m	j,m	-	CHR2	?	+
DG772		+	j,m	j,m	-	CHR1	+	-
DG680		+	j,m	j,m	Nt	CHR4	?	?
DG1095		+	j,m	j,m	Nt	CHR12	?	+

**Tableau D1 :**

Récapitulatif des antigènes pré-érythrocytaires connus à présent. Les antigènes en gris sont les antigènes caractérisés dans cette thèse.

NT : Non testé

1 : La présence aux stades pré-érythrocytaires d'autres antigènes (MSP-1, ) a aussi été suggérée, mais les résultats préliminaires restent à confirmer. Les références soulignées indiquent l'année de découverte de l'expression pré-érythrocytaire.

2. S : sporozoïte ; H : Stade hépatique jeune et mûr ; SSA : Stade Sanguin asexué jeune et mûr ; SSS : Stade sanguin sexué. 3. ST : sub-télomérique. Les caractères en gras indiquent la forme du stade où le marquage est le plus intense.

3. La plupart des localisations chromosomales a été faites par recherche d'homologie sur des bases de données

76

Souche de souris	Prolifération lymphocytaire Index de stimulation		Interféron gamma IU/ml	
	His <sub>6</sub> -747	pGEX- NN	His <sub>6</sub> -747	pGEX- NN
C3H	8.6 ± 3.0	3.2 ± 1.1	7.0 ± 0.4	4.0 ± 0.9
C3H	23.6 ± 5.9	8.8 ± 2.9	7.0 ± 0.7	4.0 ± 0.2
C3H	3.0 ± 0.9	1.1 ± 0.1	16.0 ± 1.9	1.0 ± 2.1
Positifs	2/3	-	1/3	-
BALB/c	2.7 ± 0.2	1.3 ± 0.2	40.0 ± 5.0	24.0 ± 3.0
BALB/c	23.6 ± 4.3	3.0 ± 0.3	15.0 ± 4.4	8.0 ± 1.8
BALB/c	33.7 ± 7.2	5.9 ± 0.3	16.0 ± 1.5	10.0 ± 4.2
Positifs	2/3	-	3/3	-

Tableau 3.1a.

Stimulation de proliférations cellulaires et de sécrétion d'IFN- $\gamma$  par His<sub>6</sub>-747 après 3 immunisations avec pNAK747. pGEX-NN : antigène de *P. falciparum* non cross-réactif avec His<sub>6</sub>-747. Les résultats positifs sont en gras.

souche de souris	Prolifération lymphocytaire Index de stimulation		Interféron gamma IU/ml	
	His <sub>6</sub> -772	pGEX- NN	His <sub>6</sub> -772	pGEX- NN
C3H	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	23.9 ± 2.0	10.7 ± 2.9
C3H	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.1	1.7 ± 2.0	3.3 ± 2.1
C3H	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.2	6.6 ± 0.1	5.8 ± 2.6
Positifs	0/3	-	1/3	--
BALB/c	3.5 ± 0.3	2.7 ± 0.4	24.0 ± 2.2	10.8 ± 3.0
BALB/c	1.9 ± 0.3	1.2 ± 0.4	31.3 ± 7.1	5.6 ± 0.9
BALB/c	3.2 ± 0.9	1.5 ± 0.2	25.0 ± 12.1	6.9 ± 1.5
Positifs	1/3	-	3/3	-

Tableau 3.1b.

Stimulation de proliférations cellulaires et de sécrétion d'IFN- $\gamma$  par His<sub>6</sub>-772 après 3 immunisations avec pNAK772. pGEX-NN : antigène de *P. falciparum* non cross-réactif avec His<sub>6</sub>-772. Les résultats positifs sont en gras.

77

souris	Prolifération (I.S.)	Sécrétion d'IFN- $\gamma$	Anticorps
C3H	$2.3 \pm 0.3$	$2.2 \pm 2.0$	-
C3H	$1.8 \pm 1.1$	$15.6 \pm 4.0$	-
C3H	$3.2 \pm 1.3$	$0.5 \pm 0.2$	-
Positifs	2/3	1/3	
BALB/c	$4.3 \pm 1.6$	$26.2 \pm 6.3$	-
BALB/c	$5.3 \pm 0.6$	$29.3 \pm 8.5$	-
BALB/c	$15.3 \pm 2.2$	$12.7 \pm 8.7$	-
Positifs	3/3	3/3	

**Tableau 4.1**

Réponses cellulaires de souris après 5 immunisations avec pNAK438.

Les taux de réponses sont représentés par rapport aux réponses obtenues par une valeur seuil. La valeur seuil est calculée en faisant la moyenne des réponses d'animaux non-immunisés et celle des animaux immunisés contre un antigène non-relevant, comme l'OspC, une protéine de la *Borrelia burgdorferi*.

78

Parasites	a-His <sub>6</sub> -680 souris ou humains
Sporozoïtes <i>P. falciparum</i> NF54	++
Sporozoïtes <i>P. yoelii</i> clone 1.1	++
Stade hépatique <i>P. falciparum</i>	++
Stade sanguin T23 anneaux/schizontes	++/+++ (75%)
Stade sanguin NF54 anneaux/schizontes	++/+++ (75%)

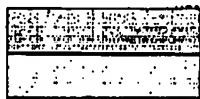
**Tableau 4.2**

Détection d'expression par IFI avec des anticorps humains immunopurifiés ou des sérums de souris spécifiques anti-His<sub>6</sub>-680.

Les sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* viennent de la souche NF54. T23 : souche de provenance thaï, NF54 souche d'origine africaine.

79

	P43	P263	P322	P453	P525	P563	P571
E43							
E263							
E322							
E453							
E525							
E563							
E571							
E676f							
E571							



Réaction forte

Réaction moyenne

Tableau 5.1 :

Réactivités croisées détectées en Western blots entre les membres de la famille Pfl 1-1.

E : anticorps immunopurifiés (élus) sur les protéines recombinantes correspondantes.

P : protéine recombinante.

clones PM	PCR571 (1)	sonde contrôle
43	+++	++
88	++	0
322	+++++	+++++
525	++++	+++++
563	++++	++++
571	+++++	+++++
676f	+++++	++++
729E	+++	+++++
263	++++	NT
381	++	NT
453	+++	NT

Tableau 5.2.

Réactivités croisées au niveau nucléotidique entre les clones de la famille Pfl 1-1.

L'intensité du signal est symbolisé par des croix. NT : non testé.

80

Clone	Taille nucléotidique 1 (bp)	Répétitions acides aminés	Homologie  Nucléotides Protéines	Degré d'homologie avec 571 Nucléotides Protéines
DG43	<u>900</u>	PIVeELLEE	Pf11-1 Part 1 : 94 %, 100% (=88)	80%, 80%
DG88	<u>900</u>	PIVeELLEE	Pf11-1 Part 1 : 94 %, 100% (=43)	Idem DG43
DG263-7	253	Non	<i>P. falciparum</i> Chr 12 95%, 60%	-
DG263-8	176	Non	<i>P. f.</i> CHR12 95%, 45% human chr22 58%	-
DG322-1	<u>500</u>	-	-	-
DG322-2	<u>2000</u>	PeeVLEEVI	Pf11-1 86 %, 65%	79% -
DG381	<u>400</u>	PEkIVEEVI	plastid tRNA 100%, CHR2 71%	-
DG453	<u>300</u>	PIVEEvVEE	Pf11-1 Part 2 88%, 83%	93%, 72%
DG525	<u>450</u>	PeIeEVEvI	GLURP R2 98%, 100%	-
DG563	438	PIVEEvVEE	Pf11-1 Part 4 : 86%, Part 1 68%	75%, 56%,
DG571	<u>550</u>	PEEIEEIV	Pf11-1 Part 5 87 %, 55%	100 %, 100%
DG676f	2000	PvVEEvLEE	Pf11.1 Part 488 %, Part 5 75%	74%, 44%
DG729E	<u>1.7</u>	-	mal3P5 100%	-

Tableau 5.3 :

Homologies de séquences des clones étudiés étudiés par BLAST.

1 : Taille estimée par rapport aux produits PCR obtenus, ou la taille précise lorsque le clone entier a été séquencé.

CHR : Chromosome; part : partie



81

Parasites	$\alpha$ -His <sub>6</sub> -571, $\alpha$ Vi571 souris ou humains
Sporozoïtes <i>P. falciparum</i> NF54	++
Sporozoïtes <i>P. yoelli</i> clone 1.1	++
Stade hépatique <i>P. falciparum</i>	++
Stade sanguin T23 anneaux/schizontes	++/+++ (75%)
Stade sanguin NF54 anneaux/schizontes	++/+++ (75%)

**Tableau 5.4**Réactivité en IFI testés avec des anticorps spécifiques aux His<sub>6</sub>-571 et Vi571.

82

souche de souris	Prolifération lymphocytaire		Interféron gamma	
	Index de stimulation		IU/ml	
	571 pGEX	NNpGEX	571 pGEX	NNpGEX
C3H morte	$0.9 \pm 0.1$	$0.7 \pm 0.05$	$31.0 \pm 2.5$	$21.21 \pm 10.6$
C3H	$0.9 \pm 0.2$	$0.7 \pm 0.1$	$30.2 \pm 2.6$	$10.50 \pm 2.03$
C3H	$0.8 \pm 0.2$	$0.9 \pm 0.2$	$16.8 \pm 0.1$	$6.65 \pm 2.8$
Positifs	0/3	-	2/3	-
BALB/c	$3.5 \pm 0.3$	$2.7 \pm 0.13$	$23.1 \pm 0.9$	$10.36 \pm 2.2$
BALB/c	$1.9 \pm 0.3$	$1.2 \pm 0.1$	$15.9 \pm 2.1$	$8.63 \pm 3.9$
BALB/c (morte)	$3.2 \pm 0.9$	$1.5 \pm 0.1$	$5.3 \pm 1.3$	$1.06 \pm 0.5$
Positifs	2/3	-	3/3	-

**Tableau 5.5**

Réponses cellulaires des souris immunisées avec pNAK571.

NNpGEX : recombinant de fusion GST de LSA3 non relevant.

68

**REVENDEICATIONS:**

- 1- Polynucléotide purifié caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID NO 1. (DG747)  
5
- 2- Polynucléotide purifié caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID NO 2. (DG772)
- 3- Polynucléotide purifié caractérisé en ce qu'il présente au moins 80 % d'homologie avec une séquence polynucléotidique selon la revendication 1 ou la revendication 2.  
10
- 4- Polynucléotide purifié caractérisé en ce qu'il s'hybride dans des conditions de fortes stringences avec un polynucléotide selon la revendication 1 ou la revendication 2 ou la revendication 3.  
15
- 5- Polypeptide purifié caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID NO 3. (DG747)
- 20 6- Polypeptide purifié caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID NO 4. (DG772)
- 7- Polypeptide purifié caractérisé en ce qu'il est codé par la séquence nucléotidique selon la revendication 1.  
25
- 8- Polypeptide purifié caractérisé en ce qu'il est codé par la séquence nucléotidique selon la revendication 2.
- 9- Molécule polypeptidique purifiée caractérisée en ce qu'elle comprend au moins 10 acides aminés consécutifs d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 5 à 8.  
30

69

- 10-Molécule polypeptidique recombinante caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 5 à 8.
- 5 11-Molécule polypeptidique chimérique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 5 à 8.
- 12-Molécule polypeptidique purifiée caractérisée en ce qu'elle présente au moins 40% d'identité avec un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 5 à 8.
- 10 13-Molécule antigénique caractérisée en ce qu'elle consiste en la molécule polypeptidique selon l'une quelconque des revendications 5 à 12.
- 14-Composition immunogène caractérisée en ce qu'elle contient au moins une molécule polypeptidique selon l'une quelconque des revendications 5 à 13 et au moins un véhicule pharmaceutique.
- 15 15-Composition immunogène selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'elle contient l'adjuvant SBAS2.
- 20 16-Composition immunogène selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'elle contient l'adjuvant incomplet de Freund.
- 17-Composition immunogène selon la revendication 14 caractérisée en la molécule polypeptidique est adsorbé sur des microparticules.
- 25 18-Composition immunogène selon la revendication 14 caractérisée en la molécule polypeptidique est sous forme d'ADN dans le vecteur VR1020 en PBS.
- 30 19- Composition immunogène selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'elle ne contient pas d'adjuvant de l'immunité.

- 20-Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 14 à 19 caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un épitope choisi dans le groupe suivant : protéine CS, MSP-1, MSP-3, LSA-1, TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II ou LSA-3.
- 5
- 21-Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 14 à 19 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre les épitopes suivants : protéine CS, MSP-1, MSP-3, LSA-1, TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II et LSA-3.
- 10
- 22-Composition immunogène selon la revendication 20 ou 21 caractérisée en ce qu'elle permet l'obtention de réponse cellulaire et humorale in vivo et in vitro.
- 15
- 23-Composition immunogène selon les revendications 20 ou 21 ou 22 caractérisée en ce qu'elle permet l'obtention de sécrétion d'INF- $\gamma$  de cellules provenant d'humains immunisés par des sporozoïtes irradiés
- 20
- 24-Composition immunogène selon les revendications 20 ou 21 ou 22 ou 23 caractérisée en ce qu'elle permet l'obtention de réponse humorale IgG.
- 25
- 25-Composition immunogène selon la revendication 24 caractérisée en ce qu'elle permet l'obtention de réponse humorale de type IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4.
- 25
- 26-Composition de vaccin anti-palustre contenant au moins une molécule polypeptidique conforme à l'une des revendications 5 à 13.
- 30
- 27-Composition de vaccin anti-palustre selon la revendication 26 caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un épitope choisi dans le groupe suivant : protéine CS, MSP-1, MSP-3, LSA-1, TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II ou LSA-3.

**28-Composition de vaccin anti-palustre selon la revendication 26 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre les épitopes suivants : protéine CS, MSP-1, MSP-3, LSA-1,TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II et LSA-3.**

**5 29-Anticorps polyclonaux purifiés ou anticorps monoclonaux purifiés reconnaissants spécifiquement les molécules selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.**

**10 30-Méthode de diagnostic in vitro du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par Plasmodium falciparum comprenant les étapes suivantes :**

**a- Mise en contact d'un tissu ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par Plasmodium falciparum avec un anticorps selon la revendication 29 dans des conditions permettant une réaction immunologique,**

**15 b- Détection in vitro des complexes Immuns formés.**

**31-Méthode de diagnostic in vitro du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par Plasmodium falciparum comprenant les étapes suivantes :**

**20 a- Mise en contact d'un tissu ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par Plasmodium falciparum avec une molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 dans des conditions permettant une réaction immunologique entre au moins une desdites molécules et les anticorps éventuellement présents dans ledit tissu ou ledit fluide biologique,**

**25 b- Détection in vitro des complexes Immuns éventuellement formés.**

**32-Méthode selon la revendication 31, caractérisée en ce qu'à l'étape 1, le tissu ou le fluide biologique sont mis en contact avec une composition comprenant une molécule polypeptidique selon l'une quelconque des revendications 5 à 13 et au moins un épitope choisi dans le groupe suivant : protéine CS, MSP-1, MSP-3, LSA-1,TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II ou LSA-3.**

## 72

- 33-Méthode selon la revendication 29, caractérisée en ce qu'à l'étape 1, le tissu ou le fluide biologique sont mis en contact avec une composition comprenant une molécule polypeptidique selon l'une quelconque des revendications 5 à 13 et les épitopes suivants : protéine CS, MSP-1, MSP-3, LSA-1, TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II et LSA-3.
- 34-Composition pharmaceutique comportant à titre de substance active un ou plusieurs anticorps polyclonaux ou monoclonaux selon la revendication 29 en association avec un véhicule pharmaceutique acceptable.
- 35-Composition pharmaceutique selon la revendication 34 caractérisée en ce qu'elle comprend l'adjuvant SBAS2.
- 36-Composition pharmaceutique selon la revendication 34 caractérisée en ce qu'elle ne contient pas d'adjuvant.
- 37-Utilisation d'une molécule polynucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du paludisme.
- 38-Utilisation d'une molécule polypeptidique selon l'une quelconque des revendications 5 à 13 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du paludisme.
- 39-Utilisation d'un ou plusieurs anticorps polyclonaux ou monoclonaux selon la revendication 29 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du paludisme.
- 40-Conjugués constitués de molécules polypeptidiques selon l'une quelconque des revendications 5 à 13 et d'un support sur lequel lesdites molécules sont adsorbées.

73

- 41-Conjugués selon la revendication 40 caractérisé en ce que le support est constitué de microsphères ou bille de latex ou de polystyrène.
- 5 42-Utilisation d'un conjugué selon l'une des revendications 40 ou 41 à l'immunisation d'individus infectés ou susceptibles d'être infectés par le paludisme.
- 10 43-Vecteur recombinant pour le clonage d'une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et/ou l'expression d'un polypeptide codé par lesdites séquences, contenant lesdites séquences dans l'un des sites non essentiels pour sa réplication, ledit vecteur étant notamment de type plasmide cosmide ou phage.
- 15 44-Vecteur XXX déposé à la C.N.C.M. le XX Mai 2001 sous le numéro d'accession I-XXX.
- 45-Vecteur XXX déposé à la C.N.C.M. le XX Mai 2001 sous le numéro d'accession I-XXX.
- 20 46-Cellule hôte transfectée par un vecteur selon l'une quelconque des revendications 43 à 45.
- 47-Kit pour le diagnostic in vitro du paludisme comprenant les éléments suivants :
- 25 a- une molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 13,  
b- les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction,  
c- les réactifs permettant la détection des complexes antigènes-anticorps produits par la réaction immunologique, ces réactifs pouvant également porter un marqueur ou être susceptibles
- 30 d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué.



## 74

48-Kit pour le diagnostic in vitro du paludisme comprenant les éléments suivants :

- a- Des anticorps selon la revendication 29,
  - b- les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction,
  - 5 c- les réactifs permettant la détection des complexes antigènes-anticorps produits par la réaction immunologique, ces réactifs pouvant également porter un marqueur ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué.
- 10 49- Kit pour le diagnostic in vitro du paludisme selon la revendication 47 caractérisé en ce qu'il comprend au moins une molécule peptidique choisie dans le groupe suivant : protéine CS, MSP-1, MSP-3, LSA-1,TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II ou LSA-3.
- 15 50-Kit pour le diagnostic in vitro du paludisme selon la revendication 47 caractérisé en ce qu'il comprend en outre les molécules peptidiques suivantes : protéine CS, MSP-1, MSP-3, LSA-1,TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II et LSA-3.
- 20 51-Kit pour le diagnostic in vitro du paludisme selon l'une quelconque des revendications 47 à 50, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'adjuvant SBAS2.

83

**FIGURE 1A: SEQ ID NO 1 (DG747) Format BLASTA**

1 GAATTCCTATA TGCACGATTA CATATATGAT GATCGTATCT ACAATAATGA TAAAGAGAAA  
 61 AATGTTATAA AAAGTGATAA TAAAAATGTT ATAAAAAGTG ATAATAAAAA TGATTATAAA  
 5 121 AAGTGTAATA AAAATGTTAT AAAAAGTGAT AATAAAAAATG TTATAAAAAG TGATAATAAA  
 181 AATGTGGAAT TC

**FIGURE 1B: SEQ ID NO 2 (DG772) Format BLASTA**

10

1 GAATTCCTCAG ATCCTCGAAG TAATGACCAA GAAGATGCTA CTGACGATGT TGTAGAAAAT  
 61 AGTAGAGATG ATAATAATAG TCTCTCTAAT AGCGTAGATA ATCAAAGTAA TGTTTTAAAT  
 121 AGAGAAGATC CTATTGCTTC TGAAGTGAAG GTTGTAAGTG AACCTGAGGA TTCAAGTAGG  
 181 ATAATGACTA CAGAAGTTCC AAGTACTACT GTAAAAACCC CTGATGAAAA ACGATCTGAA  
 15 241 GAAGTAGGAG AAAAAGAAGC TAAGCAAATT AAAGTAGAAC CTGTTGTACC AAGAGCCATT  
 301 GGAGAACCAA TGGAAAATTC TGTGAGCGTA CAGTCCCCTC CTAAGGAATT C

**FIGURE 1C: SEQ ID NO 3 (DG747) Format BLASTA**

20

1 EFHMHDIYD DRIYNNDEK NVIKSDNKNV IKSDNKNQYK KCKNVIKSD NKNVIKSDNK  
 61 NVEF

**FIGURE 1D: SEQ ID NO 4 (DG772) Format BLASTA**

25

1 EFPPRSDNQ EDATDDVVEN SRDNNLSLN SVDNQSNVLN REDPIASETE VVSEPEDSSR  
 61 IMTTEVPSTT VKPPDEKRSE EVGEKEAKEI KVEPVVPRAI GEPMENSVSQ QSPPEF

30

84

10                      20                      30                      40                      50                      60                      70  
 ATGAAGACGCAAAAGAAAAATGACAATAATAACATAGTACATTATGTAGATTGGATAAACAGATTTTTAAAAAGAAT  
 M K T T K E N D N N I V H Y V D W I N Q I F K K N  
 . R R Q K K M T I I T . Y I M . I G . T R F L K R I  
 E D D K R K . Q . . H S T L C R L D K P D F . K E F

80 90 100 110 120 130 140 150  
TCTTTACAATGTGATTTATATTTTGGGATGACAACAAAGAAAGATGTTAGTAAGAAAAGAAAGCTCAATTGAAG  
S L Q C D L Y F L D D N K E K D V S K K R K A Q L K  
L Y N C I L Y I F W M T T R K K K M L V R K E K L N . R  
F Y T M . F I F F G . Q Q R K R C . . E K K S S I E G

160 170 180 190 200 210 220 230  
 GATGAATATGATAATATATCAAGGAGCAAAAGAAATATTATTAATTCCTCCAAAAATAAAAAATGAATTAAGTATAAAA  
 D E Y D N I S R S K E N I N N S K K I K N E L S I K  
 M N M I I Y Q G A K K K I L I I P K K K K M N N V K  
 . I . Y I K E Q R K Y . . F Q K N K K . I K Y K R

240 250 260 270 280 290 300 310  
GATAATAT  
D N M

[REDACTED]
430
440
450
460

[REDACTED]
AAAAGTGATAATAAATAATGTTATAAAAAGTGATTATAAAAAGTGATGAT

[REDACTED]
V I K S D N K N V I K S D N K N V I K S D Y K S E D

[REDACTED]
L . K V I I K M L . K V I I K M L . K V I I K V M I

[REDACTED]
Y K K . . . K C Y K K . . . K C Y K K . L . K . . .

85

470        480        490        500        510        520        530        540  
 AGAAATGCTTGTGATATTTATAAAAGTAATAAAAAAATGTTCTGATAATTGCCATATATATGATGATAATAGTTCA  
 R N A C D I Y K S N K K N V P D N C H I Y D O N S S  
 E M L V I F I K V I K K M F L I I A I Y M M I I V Q  
 K C L . Y L . K . . K K C S . . L P Y I . . . F S  
  
 550        560        570        580        590        600        610        620  
 GTTGAATAATTTAGATGGAAAAATAAATTAATAATATAAGGAACATACATAATGATAACTCATCTTCATGCGATATA  
 V E N L D G K N K L N N I R N I H N D N S S S C D I  
 L K I . M E K I N . I I . G T Y I M I T H L H A I Y  
 . K F R W K K . I K . Y K E H T . . . L I F M R Y I  
  
 630        640        650        660        670        680        690        700  
 TCCGATATAAAAAGTGAAGATGAATATATAGAACCATATGAAAAAAGAAATGAAGAAAAATATAAATGAATATAAGAAT  
 S D I K S E D E Y I E P Y E K K N E E N I N E Y K N  
 P I . K V K M N I . N H . M K K R M K K I . M N . R I  
 R Y K K . R . I Y R T I . K K E . R K Y K . I . E .  
  
 710        720        730        740        750        760        770        780  
 AAGAAAAATATAGCCATGAATAATATAAAGAAGCAAGAGTTCAATTTATAATGATGAACATAATTATAATTCATTA  
 K K N I A N E N I K E G K S S I Y N D E E N Y N S L  
 R K I . P M K I . K K E R V Q F I M M N I I I I H Y  
 E K Y S Q . K Y K R R K E F N L . . . T . L . F I I  
  
 790        800        810        820        830        840        850  
 TTATATAATTCCTGTATGGTGAATAAGTAAGATCAACAAAATAAGTAGTCATAATAATATTGATAATAATATGGAT  
 L Y N S C N G E I S K I N K I S S H N N I D N N M D  
 Y I I L V M V K . V R S T K . V V I I I L I I I W I  
 I . F L . W . N K . D Q Q N K . S . . Y . . . Y G .  
  
 860        870        880        890        900        910        920        930  
 AATTATAATACGTTTGCAATGTGAATTAATTTTATAATATATTCCTCAGATGATGAAGATAATATATCAATATTAT  
 N Y N T F A N V N N F I I Y S S D D E D N I S N Y Y  
 I I I R L Q M . I I L . Y I P Q M M K I I Y Q I I I  
 L . Y V C K C E . F Y N I F L R . . R . Y I K L L .  
  
 940        950        960        970        980        990        1000        1010  
 AATGGTAAAGACGTATTAAATGATGAGATTATGTTCCCTATAAAATTTAATTTTGAATAATTAATAATAATTTAT  
 N G K P V L N D E I M F P I K F N F E K L K K N I Y  
 M V K T Y . M M R L C S L . N L I L K N . K K I F M  
 W . R R I K . . D Y V P Y K I . F . K I K K K Y L C

86

1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090  
 GTAATAGAGCATATAGACAAAATATATTATGATACATTTTAAATAAAAAATCCAAGTGAAAAAGTGTTTTATGAAT  
 V I E H I D K I Y Y D T F L N K N P S E K S V F M N  
 . S I . T K Y I M I H F . I K I Q V K K V F L . M  
 N R A Y R Q N I L . Y I F K . K S K . K K C F Y E .

1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170  
 GATGAATCTACTGTTTATTGAAAAATGATGTGAATGACAAATGTGTGTTGATAATATAAATGTTTATTAATCCTTCT  
 D E S T G Y L K N D V N D K C V V D N I N V I N P S  
 M N L L V I . K M M . M T N V L L I I . M L L I L L  
 . I Y W L F E K . C E . Q M C C . . Y K C Y . S F .

1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240  
 AGTGTGAATACGTTGAGTAATATTTCAAATATTAGGAATGAAAAATAGAAAAATATAAAGATGAAAAATTATA  
 S V N T L S N I S N I R N E K I E N N K N E K L I  
 V . I R . V I F Q I L G M K K . K I I I R M K N .  
 C E Y V E . Y F K Y . E . K N R K . . . E . K I N K

1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320  
 AAATCATATCCTACACAATCAAAAAATGTTATGAGTACATTTTCCTTTTGGAAATATTGAAAAGGAGACATTTATAACA  
 K S Y P T Q S K N V M S T F S F N N I E K E T F I T  
 N H I L H N Q K M L . V H F P F G I L K R R H L . Q  
 I I S Y T I K K C Y E Y I F L L E Y . K G D I Y N K

1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400  
 AAACCTTGTATGCACAAAATTTGAGAAAAAACAAATTTAGTTTATTAGATGAATCTGAAGAGATGATAAGAATTAT  
 K P L Y A Q N L R K K Q F S L L D E S E E M I R N Y  
 N L C M H K I . E K N N L V Y . M N L K R . . E I I  
 T F V C T K F E K K T I . F I R . I . R D D K K L F

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480  
 TCATCTAATCAATATCTATAAAATTTGTACCAAGACATTTATTATATGTAATGAGTCAAGTTGCTTCTCGATCCTTT  
 S S N Q Y S I K F V P R H L L Y V M S Q V A S R S F  
 H L I N I L . N L Y Q D I Y Y M . . V K L L L D F F  
 I . S Y F Y K I C T K T F I I C N E S S C F S I L F

1490 1500 1510 1520  
 TTTGATCCTTTATATAGAAAGCAGTTATTTTTCGTTACTAA  
 F D P L Y R K Q L E F R Y .  
 L I L Y I E S S Y F F V T  
 . S F I . K A V I F S L L

87

Gène codant pour DG772 extrait de la base des données génome de clone 3D7 de *Plasmodium falciparum*. En bleu, la séquence correspondant au clone DG772, en rouge dans la séquence la différences avec la séquences issue de la souche T9.96 (position 3612)

```

      10      20      30      40      50      60      70
      |      |      |      |      |      |      |
ATCAAAGGGAAATGAATATGTGTTTGTCTTCTATCTATATTATATGTTGTATATGTACCTATGTATTAGGT
M K G K M N M C L F F F Y S I L Y V V L C T Y V L G
• K G K • I C V C F F S I L Y Y M L Y Y V P M Y • V
E R E N E Y V F V F F L F Y I I C C I M Y L C I R Y

      80      90      100      110      120      130      140      150
      |      |      |      |      |      |      |      |
ATAAGTGAAGACTATTGAAGGAAAGGCCCAAGGTTTAAATGTTGAGACTAATAATAATAATAATAATAATAAT
I S E E Y L K E R P Q G L N V E T N N N N N N N N N
• V K S I • R K G P K V • M L R L I I I I I I I I I I
K • R V F E G K A P R F K C • D • • • • • • • • • •

      160      170      180      190      200      210      220      230
      |      |      |      |      |      |      |      |
AATAATAGTAATAGTAACGATGCGATGTCTTTTGAATGAAGTAATAAGGTTTATAGAAAACGAGAAGGATGATAAA
N N S N S N D A M S F V N E V I R F I E N E K D D K
I I V I V T M R C L L • M K • • G L • K T R R M I K
• • • • • R C D V F C K • S N K V Y R K R E G • • R

      240      250      260      270      280      290      300      310
      |      |      |      |      |      |      |      |
GAAGATAAAAAAGTGAAGATAATATCTAGACCTGTTGAGAATACATTACATAGATATCCAGTTAGTTCTTTCTGAAT
E D K R V K I I S R P V E N T L H R Y P V S S F L N
K I K K • R • Y L D L L R I H Y I D Y Q L V L F • I
R • K S E D N I • T C • E Y I T • I S S • F F S E Y

      320      330      340      350      360      370      380      390
      |      |      |      |      |      |      |      |
ATCAAAGATATGGTAGGAAAGGGGAATATTTGAATAGAAATAGTTTGTTCAGAGATCATATATAAGGGGTTGTAA
I K K Y G R K G E Y L N R N S F V Q R S Y I R G C K
S R S M V G R K G N I • I E I V L F R D H I • G V V K
Q K V W • E R G I F E • K • F C S K I I Y K G L • R

      400      410      420      430      440      450      460
      |      |      |      |      |      |      |
GGAAAAAGAAGCACACATACATGGATATGTGAAAATAAAGGGAATAATAATATATGTATTCCTGATAGACGTGTACAA
G K R S T H T W I C E N K G N N N I C I P D R R V Q
E K E A H I H G Y V K I K G I I I Y V F L I D V Y N
K K X H T Y M D M • K • R E • • Y M Y S • • T C T I

```

88

470 480 490 500 510 520 530 540  
TTATGTATAACAGCTCTTCAGATTAAAAAATTCAGGATCTGAAACGACTGATAGAAAATTATTAAGAGATAAAGTA  
L C I T A L Q D L K N S G S E T T D R K L L R D K V  
Y V - Q L F K I - K I Q D L K R L I E N Y - E I K Y  
M Y N S S S R F K K F R I - N D - - K I I K R - S I

550 560 570 580 590 600 610 620  
TTTGATTGAGCTATGTATGAAACTGATTGTTTATGGAATAAATATGGTTTTCGTGGATTGATGATTTTGTGACGAT  
F D S A M Y E T D L L W N K Y G F R G F D D F C D D  
L I Q L C M K L I C Y G I N M V F V D L M I F V T M  
- F S Y V - N - F V M E - I W F S W I - - F L - R C

630 640 650 660 670 680 690 700  
GTAAAAAATAGTTATTTAGATTATAAAGATGTTATATTTGGAAACCGATTAGATAAAAAATAATATATCAAAGTTAGTA  
V K N S Y L D Y K D V I F G T D L D K N N I S K L V  
- K I V I - I I K M L Y L E T P I - I K I I Y Q S -  
K K - L F R L - R C Y I W N R F R - K - Y I K V S R

710 720 730 740 750 760 770 780  
GAGCAATCATTAAACGTTTTTTTAAAAAGATAGTACTGTACTTAATCCTACTGCTTGGTGGAGAAGGTATGGAACA  
E E S L K R F F K K D S S V L N P T A W W R R Y G T  
R N H - N V F L K K I V V Y L I L L L G G E G M E Q  
G I I K T F F - K R - - C T - S Y C L V E K V W N K

790 800 810 820 830 840 850  
AGACTATGGAAACTATCATACAGCCATATGCTCATTAGGATGTAGAAAACCTGATGAGAATGAACCTCAGATAAAT  
R L W K T M I Q F Y A N L G C R K P D E N E P Q I N  
D Y G K L - Y S H M L I - D V E N L M R M N L R - I  
T M E N Y D T A I C S F R M - K T - - E - T S D K -

860 870 880 890 900 910 920 930  
AGATGGATTCTGGAATGGGGGAAATATAATTGTAGATTAAATGAAGGAGAAAGAAAAATTTTAAACAGGAGAATGTTCT  
R W I L E W G K Y N C R L M K E K E K L L T G E C S  
D G F W N G G N I I V D - - R R K K N C - Q E N V L  
M D S G M G E I - L - I N E G E R K I V N R R M F C

940 950 960 970 980 990 1000 1010  
GTTAATAGAAAAAATCTGACTGCTCAACCGGATGTAATATGAGTGTATACCTATAGGAGTCTTATTAATAGACAA  
V N R K K S D C S T G C N N E C Y T Y R S L I M R Q  
L I E K N L T A Q P D V I M S V I P I G V L L I C K  
- - K K I - L L N R M - - - V L Y L - E S Y - - T K

89

1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090  
 AGATATGAGGTCTCTATATTAGGAAAAAATATATTAAAGTAGTACGATATACTATATTAGGAGAAAAATAGTTCAA  
 R Y E V S I L G K K Y I K V V R Y T I E R R K I V Q  
 D M R S L Y . E R N I L K . Y D I L Y L G E K . F N  
 I . G L Y I R K K I Y . S S T I Y Y I . E K N S S T

1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170  
 CCTGATAATGCTTTGGATTMTTTAAATTAATTTGTTCTGAGTGTAAAGGATATTGATTTTAAACCCCTTTTGAATTT  
 F D N A L D F L K L N C S E C K D I D F R P F F E F  
 L I M L W I F . N . I V L S V R I L I L N P F L N L  
 . . C F G F F K I K L F . V . G Y . F . T L F . I .

1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240  
 GAATATGCTAAATATGAAGAAAAATGTATGTGTCAATCATATATTGATTAAAAATCCAATTTAAAAATAATGATATT  
 E Y G K Y E E K C M C Q S Y I D L K L O F K N N D I  
 N M V N M K K N V C V N H I L I . K S N L K I M I F  
 I W . I . R K M Y V S I I Y . F K N P I . K . . Y L

1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320  
 TGTTCAATTTAATGCTCAACAGATACTGTTTCTAGCGATAAAAGATTTTGTCTTGAAGAAAGAAATTTAAACCATGG  
 C S F N A Q T D T V S S D K R F C L E K K E F K P W  
 V H L M L F L K L F L A I K D F V L K R K N L N H G  
 F I . C S N R Y C F . R . K I L S . K E R I . T M R

1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400  
 AAATGCTGATAAAATTTCTTTTGAACAGTTTCATCATAAAGGTGTATGTCTCACCAGAGAAGACAAGGTTTGTGTTA  
 K C D K N S F E T V H H K G V C V S P R R Q G F C L  
 N V I K I L L K Q F I I K V Y V C H R E D K V F V .  
 M . . K F F . N S S . R C M C V T E K T R F L F R

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480  
 GGAAATTTGAATATCTACTGAATGATGATATTTATAATGTACATAATTCACAACTACTTATCGAAATTATAATGGCT  
 G N L N Y L L N D D I Y N V H N S Q L L I E I I M A  
 E I . T I Y . M M I F I M Y I I H N Y L S K L . W L  
 K F E L S T E . . Y L . C T . F T T T Y R N Y N G F

1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560  
 TCTAAACAAGAACGAAAGTTATTATGGAACAAACATGGAACACTTGTGATAACCAAGATGCATGCAAAATATATAAT  
 S K Q E G K L L W K K H G T I L D N Q N A C K Y I N  
 L N K K E S Y Y G K N M E Q Y L I T R M H A N I . M  
 . T R R K V I M E K T W N N T . . P E C M Q I Y K .



90

1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630  
GATAGTTATCTTGATTATAAGATATAGTTATTGGAAATGATTATGGAATGATAACAACTCTATAAAAGTTCAAAAT  
D S Y V D Y K D I V I G N D L W N D N N S I K V Q N  
I V M L I Y K I L L E M I Y G M I T T L K F K I  
L C L R Y S Y W K F M E Q L Y K S S K

1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710  
AATTTAAATTTTATTTTCAAGAAATTTTGGTTATAAAGTTGGAAGAAATAAATCTTTAAACAAATTAAGAATTA  
N L N L I F E R N F G Y K V G R N K L F K T I K E L  
I I F L K E I L V I K L E E I N S L K Q L K N  
F K F N F K K F W L S W K K T L N N R I K

1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790  
AAAATGTATGGTGGATATTAATAGAAATAAGTATGGGAATCAATGAGATGTGGAATTGACGAAGTAGATCAACGT  
K N V W G I L N R N K V W E S M R C G I D E V D Q R  
K M Y G G Y I E I K Y G N Q D V E L T K I N V  
K C M V D I K K S M G I N E M W N R S R S T

1800 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870  
AGAAAACTTGTGAAAGATAGATGAAGTAAAGATGACCAATTTCTTAGATGGTTTTACAAATGGGCACATTTT  
R K T C E R I D E L E N M P Q F F R W F S Q W A H F  
E K L V K E M N K T C H N S L D G F H N C H I S  
K N L K N R T R K H A T I L M V F T M G T F L

1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950  
TTTTGTAAGGAAAAAGATATTGGGAATTAATTAATGATAAATGTACAGGTAATAATGGAATCCTTATGTCAG  
F C K E K E Y W E L K L N D K C T G N N G K S L C Q  
F V R K K N I G N N M I N V Q V I M E N P Y V R  
L G R R I L G I K I K M Y R W K I L M S G

1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020  
GATAAAACATGTCAAAATGTGTACTAATATGAATTTTGGACATATACTAGAAAATTAGCTTATGAAATACAAATCC  
D K T C Q N V C T N M N Y W T Y T R K L A Y E I Q S  
I K H V K M C V L I I I G H I L E N L M K Y N F  
N M S K C V Y Y E L L D I Y K I S L N T I R

2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100  
GTAAATATGATAAGATAGAAATTTATTTAGTCTTGCTAAAGACAAAAATGTAACATACATTTTAAAGGAAATGCA  
V K Y D K D R K L F S L A K D K N V T T F L K E N A  
N M I R I E N Y L V L L K T K M L H F R K M Q  
K I R K I I S C R Q K C N Y I F K G K C K

91

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180  
AAAAATTGTTCTAATATAGATTTTACAAAAATATTGATCAGCTTGACAACTCTTTAAGGAAGATGTTTCATGTATC  
K N C S N I D F T K I F D Q L D K L F K E R C S C M  
K I V L I . I L Q K Y S I S I T N S L R K D V H V W  
K L F . Y R F Y K N I R S A . Q T L . G K M F M Y G

2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260  
GATACACAAGTTTTAGAAGTAAAAACAAGAAATGTTATCTATAGACTCAAATAGTGAAGATGCCACAGATATAAGT  
P T Q V L E V K N K E M L S I D S N S E D A T D I S  
I H K F . K . K T K K C Y L . T Q I V K M R Q I . V  
Y T S F R S K K Q R N V I Y R L K . . R C D R Y K .

2270 2280 2290 2300 2310 2320 2330 2340  
GAGAAAAATGGAGAGGAAGATTATATGTAATCACAATTCTGTGAGTGTGCGCAAGTGGTAATAAAGAAATCGAAAG  
E K N G E E E L Y V N H N S V S V A S G N K E I E K  
R K M E R K N Y M . I T I L . V S Q V V I K K S K R  
E K W R G R I I C K S C F C E C R K W . . R N R K E

2350 2360 2370 2380 2390 2400 2410  
AGTAAGGATGAAAAGCAACCTGAAAAAGAAGCAAAACAACTAATGGAACCTTAACCGTACGAACTGACAAAGATTCA  
S K D E K Q P E K E A K Q T N G T L T V R T D K D S  
V R M K S N L K K K C N K L M E L . P Y E L T K I Q  
. G . K A T . K R S K T N . W N F N R T N . Q R F R

2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490  
GATAGAAACAAAGGAAAAGATACAGCTACTGATACAAAAAATTCACCTGAAAATTTAAAAGTACAGGAACATGGAACA  
D R N K G K D T A T D T K N S P E N L K V Q E H G T  
I E T K E K I Q L L I Q K I E L K I . K Y R N M E Q  
. K Q R K R Y S Y . Y K K F T . K F K S T G T W N K

2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570  
AATGGAGAAACAATAAAGAAGAACCAACCAAAATTACCTGAATCATCTGAAACATTACAATCACAAGAACAATTAGAA  
N G E T I K E E P P K L P E S S E T L Q S Q E C L E  
M E K Q . K K N H Q N Y L N H L K H Y N H K N N . K  
W R N N K R R T T K I T . I I . N . T I T R T J R S

2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640 2650  
GCAGAAGCACAAAAACAAAAACAAGAAGAACCAAAAAAACAAGAAGAAGAACCAAAAAAACAAGAAGAA  
A E A Q K Q K Q E E P K K K Q E E E P K K K Q E E  
Q K H K N K N K K K N Q K K N K K K N Q K K N K K K  
R S T K T K T R R R T K K K T R R R T K K K T R R R

99

2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730  
GAACAAAACGAGAACAAAGAACAAAACAAAGAACAAAGAACAAAACAAAGAACAAACAAATACAA  
E Q K R E Q E Q K Q E Q E E E Q K Q E E E C Q I Q  
N K N E N K N K N K N K K K K N K N K K N N K Y K  
T K T R T R T K T R T R R R T K T R R T T N T R

2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800  
GATCAATCACAAAGTGGATTAGATCAATCCTCAAAAGTAGGAGTAGCGAGTGAACAAATGAAATTTCTTCAGGACAA  
D O S Q S G L D O S S K V G V A S E O N B I S S G Q  
I N H K V D . I N P Q R . E . R V N K N K F L Q D K  
S I T K W I R S I L K S R S S E . T K . N F F R T R

2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880  
GAACAAAACGTAAGAGCTCTTCACTGAGTAGTTCACAAAGAACAACTAGTGAATGAGGTATCACAAGACACA  
E Q N V K S S S E V V P O E T T S E N G S S O D T  
N K T . K A L B L K . F H K K Q L V K M G H H K T Q  
T K R K K L F T . S S S T R N N . - K W V I T R H K

2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960  
AAATATCAAGTACTGAACCAATGAGAATTCTGTTGTAGATAGAGCAACAGATAGTATGAATTTAGATCCTGAAAG  
K I S S T E P N E N S V V D R A T D S M N L D P E K  
K Y Q V L N Q M R I L L . I E Q Q I V . I . I L K R  
N I K Y . T K . E F C C R . S N R . Y E F R S . K G

2970 2980 2990 3000 3010 3020 3030 3040  
GTTCAATGAAATATGAGTGATCCAAATACAAATCTGACCAAGATGATCTTTAAAGATGATAAGAAGGAAGTT  
V H N E N M S D P N T N T E P D A S L K D Q K K E V  
F I M K I . V I Q I Q I L N Q M H L . K M I R R K L  
S . . K Y E . S K Y K Y . T R C I F K R . . E G S .

3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120  
GATGATGCCAAAAGAACTTCAATCTACTGTATCAAGAAATTGAATCTAATGAACAGGACGTTCAAAGTACACCACCC  
E D A K K E L Q S T V S R I E S N E Q D V Q S T P F  
M N P K K N F N L L Y Q E L N L M N R T F K V H H P  
C Q K R T S I Y C I K N . I . . T G R S K Y T T R

3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190  
GAAGATACTCTACTGTTGAAGGAAAAGTAGGAGATAAGCAGAAATGTTAACTTCTCCGATCCGACAGATAATTCT  
E D T P T V E G K V G E K A E M L T S P H A T D N E  
K I L L L L K E K . E I K Q K C . L L R M R Q I I L  
R Y S Y C . R K S R R . S R N V N F S A C D R . F .

[illegible]

94

3750 3760 3770 3780 3790 3800 3810 3820  
TCTTGAAGGCAACGTCCTCTCTAATGTAGAAGATGTTGAAAAGAAAACATTGATATCTGAGAATPATGGATTACAT  
S V S V Q S P P N V E D V E K E T L I S E N N G L H  
L A Y S P L L M K M L K K K H Y L R I M D Y I  
C E R T V P S C R R C K R N I D I E W I T

3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900  
AATGATACACACAGCAAAATATCAGTGAAAAGCATTTAATCGATATTCATTTGTTAAGAAATGAAGCGGGTAGTACA  
N D T H R G N I S E K D L I D I H L L R N E A G S T  
M I H T E E I S V K R I S I F I C E M K R V V Q  
Y T Q R K Y Q K G F N R Y S F V K K S G Y N

3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970  
ATATTAGATGATTCTAGAAGAAATGGAGAAATGACAGAAAGGTAGCGAAAGTGATGTTGGAGAAATTACAGAACATAAT  
I L D D S R R N G E M T E G S E S D V G E L Q E H N  
Y M I L E M E K Q K V A K V M L E N Y K N I I  
I R F K K W R N D R R R K C W R I T R T F

3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050  
TTTAGCACRCAACAAAAGATGAAAAGATTTTGACCAAATTGCGAGCGATAGAGAAAAGAGAAATTCAAAAATTA  
F S T Q Q K D E K D F D Q I A S D E E K E E I O K L  
L A H N K K M K K I I T K L R A I E K K K K F K N Y  
H T T K R K R F P N C E R R K R R N S K I T

4060 4070 4080 4090 4100 4110 4120 4130  
CTTAATATAGGACATGAAGAGGATGAAGATGTATTAAAAATGGATAGAACAGAGGATAGTATGAGTGTGGAGTTAAT  
L N I G H E E D E D V L K M D R T E D S M S D G V N  
L I D M K R M K M Y K W I E Q R I V V M E L I  
Y R T R G R C I K N G N R G Y E W S

4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200 4210  
AGTCATTTGTATTATAATAATCTATCAAGTGAAGAAAAATGGAACAATATAATAATAGAGATGCTTCTAAAGATAGA  
S H L Y Y N N L S S E E K M E Q Y N N R D A S K D R  
V I C I I I I Y Q V R K K W N N T I I E M L L K I E  
S F V L S I K R K N G T I R C F R R

4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290  
GAAGAAATATTGAATAGGTCAAACACAATAACATGTTCTAATGAACATTCATTAAAAATATTGTCAATATATGGAAGA  
E E I L N R S N T N T C S N E H S L K Y C Q Y M E R  
K K Y I S Q T Q I H V L M N I H N I V N I W K E  
R N I E V K H K Y M F T F I K I L S I Y G K K

95

4300 4310 4320 4330 4340 4350 4360  
 AATAAGGATTATTAGAAACATGTTCTGAAGACAAAAGGTTACATTATGTTGTGAAATATCAGATTATTGTTTAAAA  
 N K D L L E T C S E D K R L N L C C E I S D Y C L K  
 I R I Y . K H V L K T K G Y I Y V V K Y Q I I V . N  
 . G F I R N M F . R Q K V T F M L . N I R L L F K I

4370 4380 4390 4400 4410 4420 4430 4440  
 TTTTCAATCCTAAATCGATAGAATACTTTGATTGTACACAAAAGAATTGATGACCCCTACATATAATTGTTTGTAGA  
 F F N P K S I E Y F D C T O K E F D D P T Y N C F R  
 F S I L N R . N T L I V H K K N L M T L H I I V L E  
 F Q S . I D R I L . L Y T K R I . . P Y I . L F . K

4450 4460 4470 4480 4490 4500 4510 4520  
 AACCAAGATTACAGTATGTCATGTTATAAAATTAACAAATATACATTAATATGTTAATAAAAAATAATATA  
 K Q R E T S M S C Y K I K N N I H . Y V N K K N N I  
 N K D L Q V C H V I K L K T I Y I N M L I K K I I Y  
 T K I Y K Y V N L . N . K Q Y T L I C . . K K . Y I

4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600  
 TTTTCTCTCTTTCTTTTCTTTTAAATAGGTATGCATTATATTGCCGGGGGGTATAATAGCCCTTTTATTGTTTA  
 F F S L F L F F . . V C I I L P G V V . . P F Y C L  
 F F L F F F F F N R Y A L Y C R G W Y N S P F I V Y  
 F F S F S F F L I G M H Y I A G G G I I A L L L F I

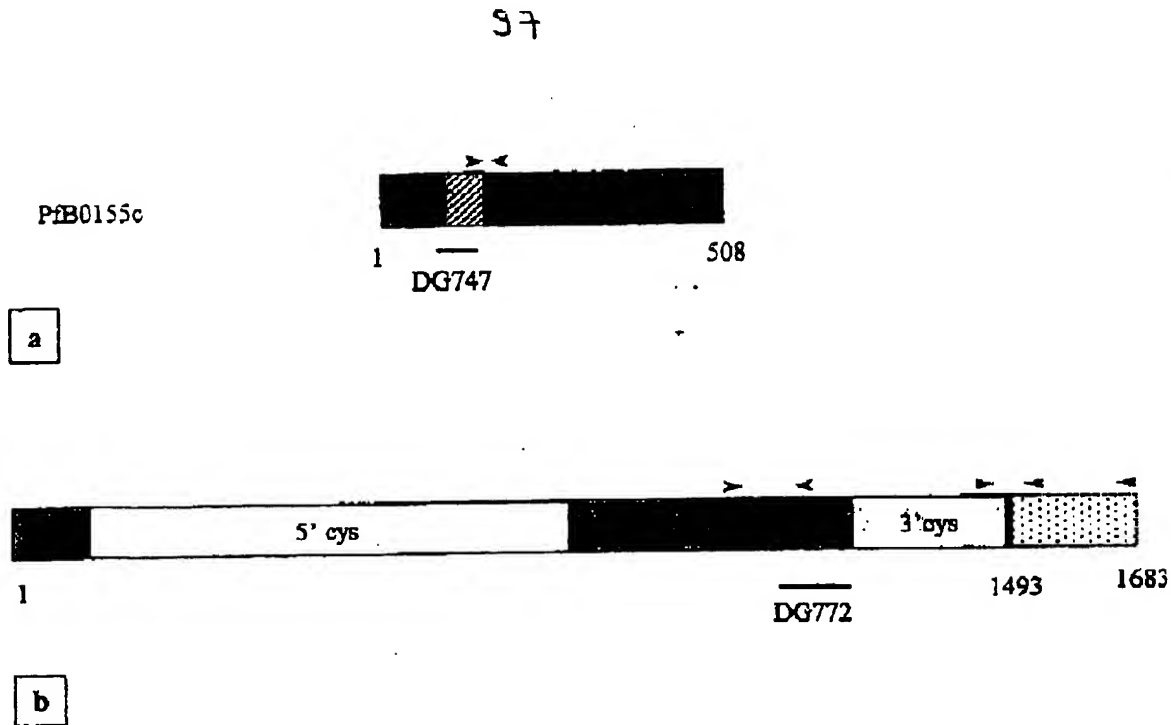
4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680  
 TTTTAGGTTACAGCCAGCTATAGGAAGAATT  
 F . V Q P A I G R I C  
 F R F S Q L . E E F V  
 L G S A S Y R K N L

GGATGATGA  
 H I Y L S I I R T Y I . I N M Y I F I L L L . G . .  
 I Y I . V L . E H I Y K . I C I F L F Y Y Y R D D E  
 Y I F K Y Y K N I Y I N K Y V Y F Y F I I I G M M K

4760 4770 4780 4790 4800 4810 4820 4830  
 AAAAGGATTCTACGATTCTAATTTAATGATTCTGCTTTTGAATATAATAATAATAATAATAATTACCTTATAT  
 K R I L R F . F K . F C F . I . . . I . . I T L Y  
 K G F Y D S N L N D S A F E Y N N N K Y N K L P Y M  
 K D S T I L I . M I L L L N I I I I N I I N Y L I C

56

4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900 4910  
GT GTAAGGAAAAAACTAAAAAACAATAATATATATATATATATATTTACGGATGCATTTCACA  
V G K K K K K K K N I Y I Y I Y I Y G C I S T  
C K E K T K K Q K K K K I Y I Y I Y I F T D A F P H  
V R K K L K N K K K K K Y I Y I Y I Y L R M H F H I  
4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990  
TTCCTATTATTCTTATTATTATATTTTATTATTATTATTATTATTTTTCGTAG TTGATCAACAAATAAA  
F L L F L I L I I F I I Y L F I F F F R S S T N K  
S Y Y F L F L F L L F I Y L F F F F V V D Q Q I N  
P I I S Y S Y N F Y Y L F I Y F F F S L I N K M  
5000 5010 5020 5030  
TGTAAGTAATTCGTATTATATTCGGAGGGTATTATGATGACACACGACATTTTAA  
C S K F F I F G G Y L  
V V N S D L Y S E G I Y D D T T T F  
I L I Y I R R V F M M

**Figure 3.1**

Représentation schématique des protéines correspondantes aux DG747 (a) et DG772 (b).

Les flèches noires indiquent la localisation des amorces utilisées pour l'étude de la conservation des fragments

Les flèches rouges indiquent les amorces utilisées dans la réaction RT-PCR.

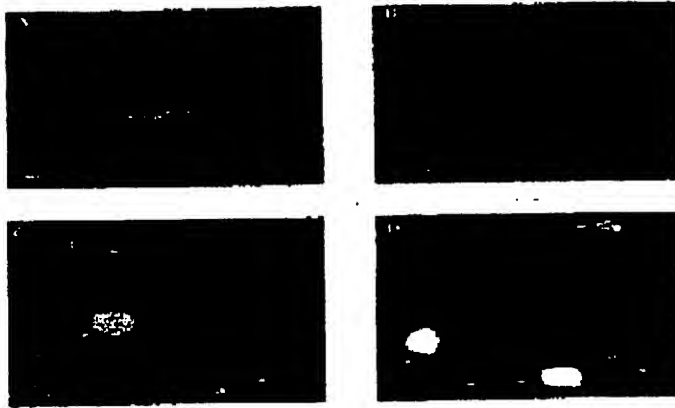
a: la partie hachurée indique la région répétitive.

b: les deux régions consensus 5' cys et 3' cys sont indiquées sur le gène.

La partie en pointillés représente les régions transmembranaires et non-transcrites supposées.

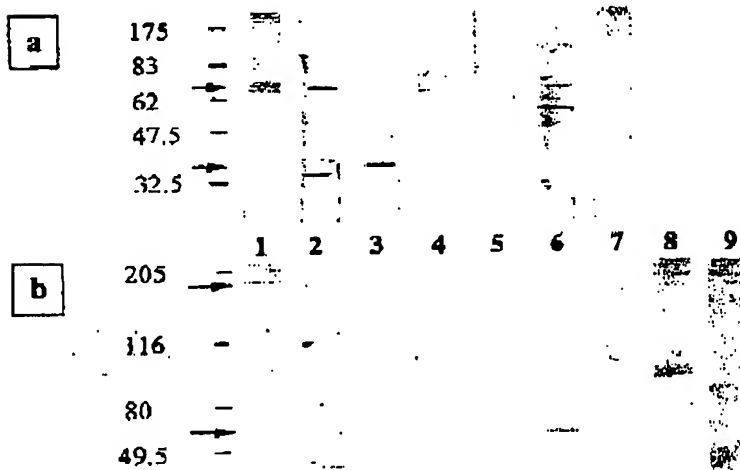


98

**Figure 3.2**

IFATs des stades sporozoïtes et sanguins de *P. falciparum* et des sporozoïtes de *P. yoelii* avec les anticorps anti-747 ou anti-772

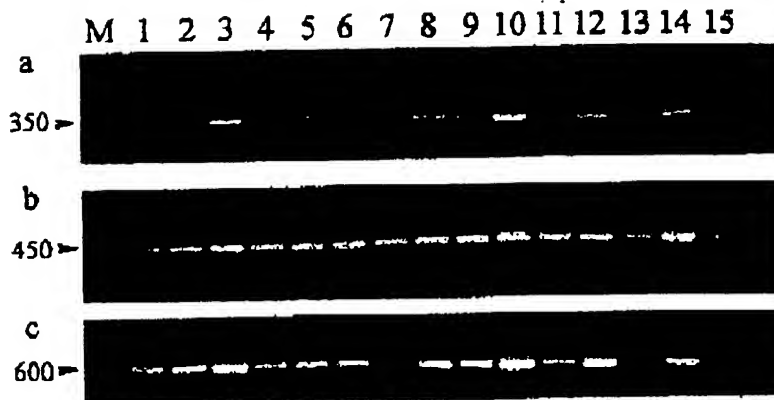
A, B: sporozoïte de *P. falciparum* (A) ou *P. yoelii* (B) marqué au anti-747 ou anti-772; C, D: stade sanguin asynchrone marqué au anti-747 (C) ou au anti-772 (D), a, t, s: formes anneaux, trophozoïtes ou schizontes, respectivement.

**Figure 3.3**

Western blots de *P. falciparum*, *P. yoelii* et *P. berghei* utilisant des anticorps anti His<sub>6</sub>-747(a) et anti His<sub>6</sub>-772 (b).

1: *P. falciparum* sporozoïtes; 2: *P. falciparum* stade sanguin formes anneaux; 3: *P. falciparum* stade sanguin formes schizontes; 4: surnageant de culture asynchrone; 5: Globules rouges humains; 6: *P. yoelii* sporozoïtes; 7: *P. yoelii* stade sanguin; 8: *P. berghei* stade sanguin; 9: Globules rouges de souris

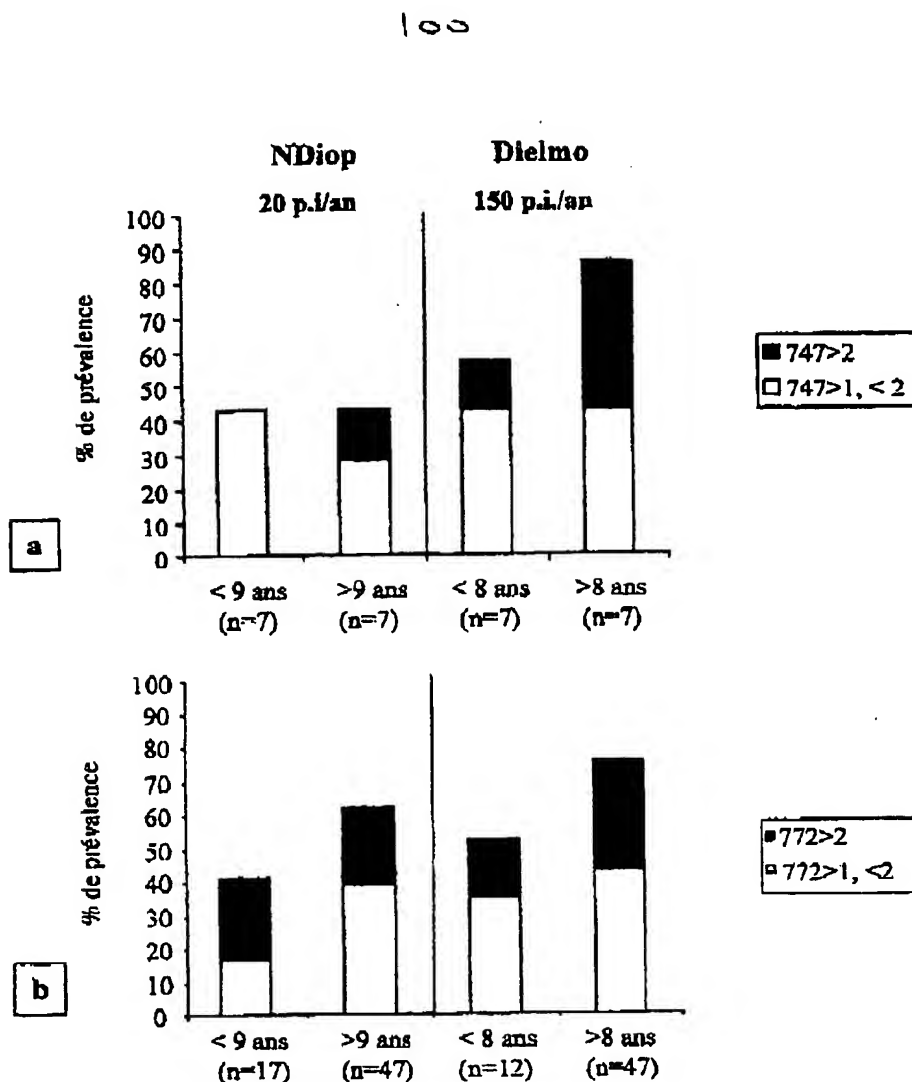
99

**Figure 3.4**

PCR d'ADN de 12 souches différentes avec des amorces spécifiques de DG747 (a) et DG772 (b). Le contrôle est un gène constitutif, le PCNA (c) [Kilbey, 1993 #519]

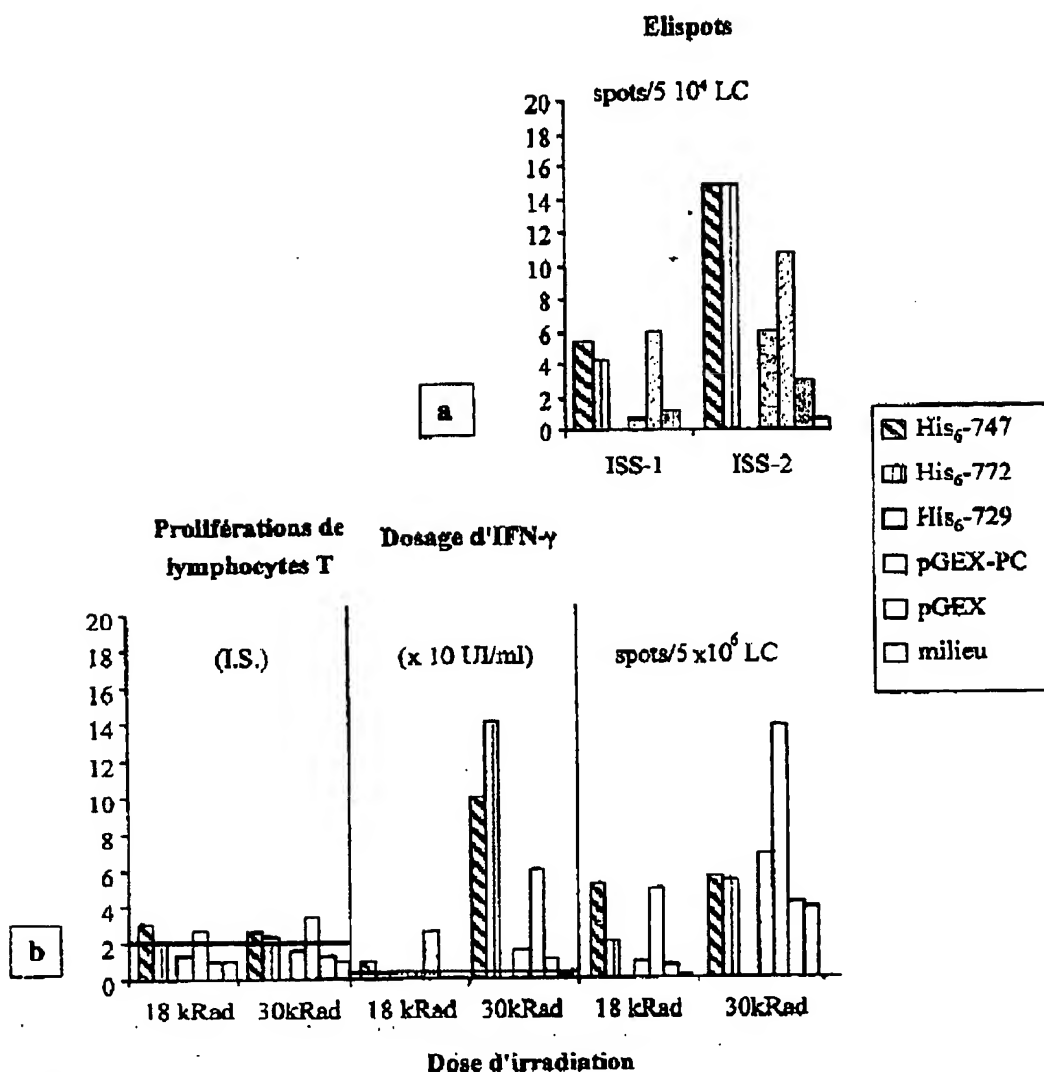
Les ADN utilisés sont issus des souches (puits 1 à 14, de gauche à droite) :

NF54, B1, F32, D7, D25, D28, D41, D50, D51, H1, L1, Mad20, T9.96, PA. Le puit 15 ne contient pas d'ADN. La taille du produit PCR, correspondant à celle attendue est indiquée à côté des flèches.

**Figure 3.5**

Prévalence des réponses humorales contre His<sub>c</sub>-747 (a) et His<sub>c</sub>-772 (b) dans deux groupes d'âge et dans deux zones d'endémie différentes

101

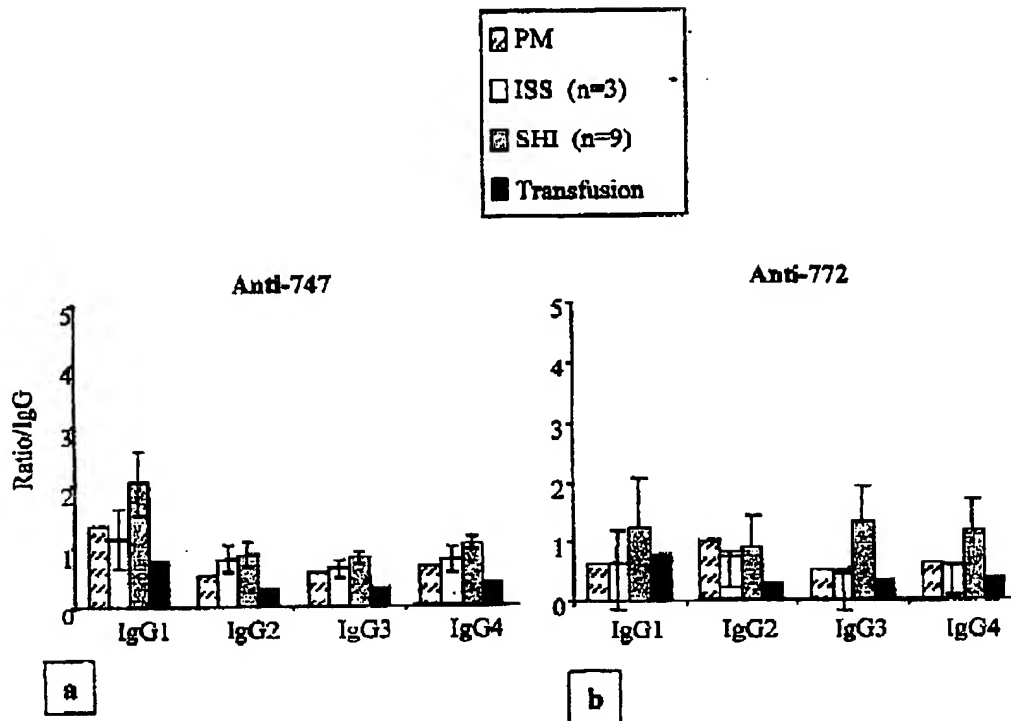
**Figure 3.6**

Réponses cellulaires contre His<sub>6</sub>-747 et His<sub>6</sub>-772 chez des humains et des chimpanzés immunisés avec des sporozoïtes irradiés. Pour une récapitulation des réponses contre tous les antigènes voir chapitre 4, figure 4.5.

a : Détection par Elispot de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  de cellules provenant d'humains immunisés par des sporozoïtes irradiés; b : réponses cellulaires des chimpanzés immunisés par des sporozoïtes irradiés, détectés par stimulation de prolifération de lymphocytes T et sécrétion d'IFN- $\gamma$  (par dosage et Elispots).

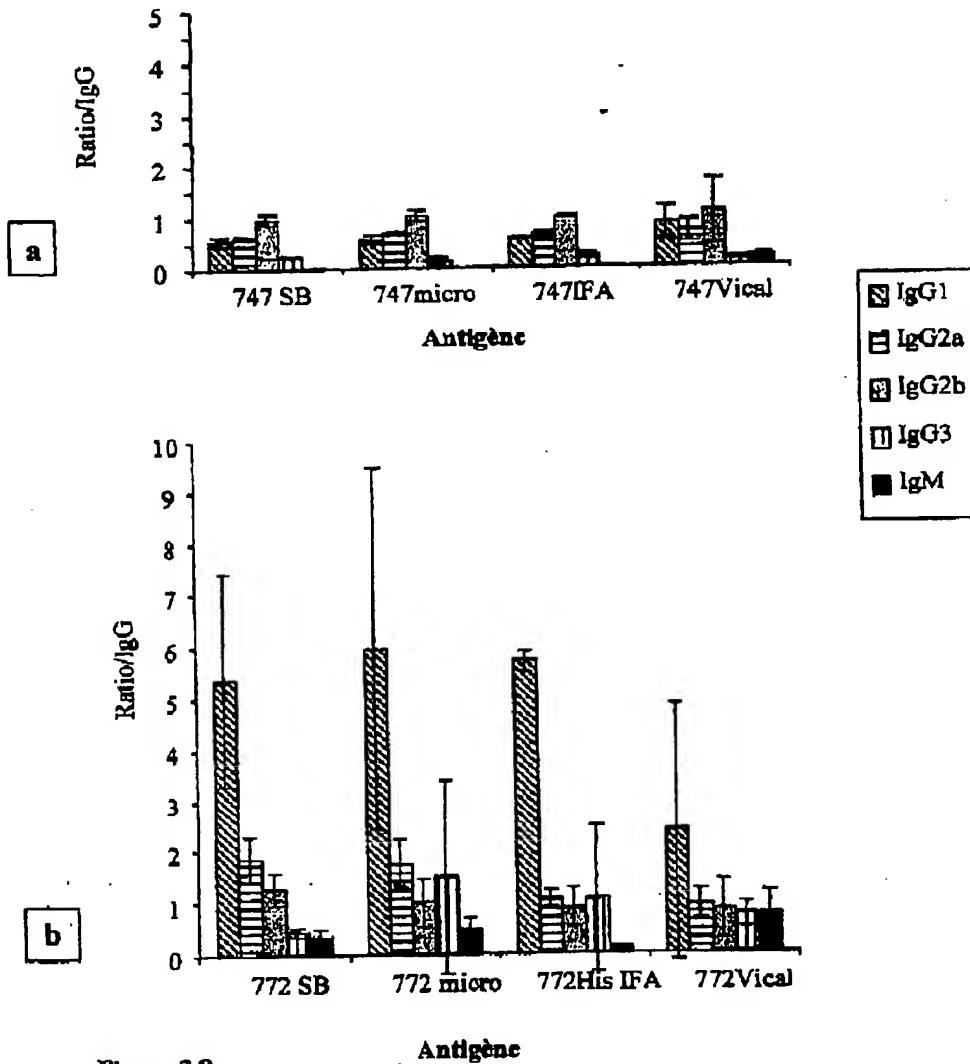
I.S. Index de stimulation, UI : Unités Internationales ; LC Leucocytes (cellules mononuclées du sang périphérique). His<sub>6</sub>-729, PC-pGEX : Recombinants appartenant à la protéine LSA3 ; pGEX : protéine GST. Les valeurs seuils sont indiquées par une droite horizontale sur le graphé.

102

**Figure 3.7**

Distribution des isotypes d'IgG dans les réponses humorales contre His<sub>g</sub>-747 et His<sub>g</sub>-772 d'individus exposés différenciellement au paludisme. ISS : Volontaires immunisés avec des sporozoïtes irradiés ; SHI : Sérum hyper-immun ; Transfusion : Sérum de personnes ayant contracté un paludisme par transfusion de sang infecté. Les taux de réponses détectés en ELISA sont représentés par rapport aux taux d'IgG total obtenus. L'écart type est indiqué sur le graphe.

103

**Figure 3.8**

Réponses humorales de souris immunisées avec quatre formulations de la protéine recombinante. a: réponses anti-747; b: réponses anti-772. SB: avec l'adjuvant SBS2A; micro: recombinant adsorbé sur des microparticules; IFA: Adjuvant incomplet de Freund; Vi: Sous forme d'ADN dans le vecteur VR1020 en PBS.